

**Untersuchungen der TGF-beta Signaltransduktionskette als  
möglicher ätiopathogenetischer Faktor  
der Induratio penis plastica**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Simone Mathilde Haag  
aus Kaiserslautern

Gießen 2005

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie  
Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Weidner

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Gießen

Gutachter: PD Dr. Hauck

Gutachter: PD Dr. Schuppe

Tag der Disputation: 02.03.2006

Gewidmet meiner Familie

<b>1. Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Grundlagen .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Induratio penis plastica.....</b>	<b>8</b>
2.1.1 Historie .....	8
2.1.2 Epidemiologie und assoziierte Erkrankungen .....	8
2.1.3 Klinik.....	9
2.1.4 Diagnostik .....	10
2.1.5 Therapie .....	11
2.1.6 Ätiopathogenese .....	12
2.1.7 Morphologie .....	13
2.1.8 Genetik und Immunologie .....	14
<b>2.2 Cytokin-Signaltransduktion .....</b>	<b>15</b>
2.2.1. Transforming-Growth-Factor-beta (TGF-beta) .....	16
2.2.2 Bone Morphogenetic Protein (BMP).....	18
2.2.3 Interferon-gamma.....	19
<b>3. Patienten und Methoden.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Patientenakquisierung .....</b>	<b>20</b>
3.1.1 Patienten mit IPP .....	20
3.1.2 Kontrollgruppe .....	21
3.1.3 Dermale Fibroblasten .....	22
<b>3.2 Anlegen von Zellkulturen .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3. RNA-Nachweis .....</b>	<b>24</b>
3.3.1 RNA-Isolation .....	24
3.3.2 Reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) .....	24
3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	28
<b>3.4 Zelnachweis .....</b>	<b>28</b>
3.4.1 Immunofluoreszenzmikroskopie .....	28
<b>3.5 Proteinnachweis .....</b>	<b>31</b>
3.5.1 Zellstimulation .....	31
3.5.1.1 Zeitreihe von TGF-beta-1, BMP-2 und IFN-gamma.....	31
3.5.1.2 Co-Stimulation mit IFN-gamma und TGF-beta-1 bzw IFN-gamma und BMP-2.....	32
3.5.2 Proteinextraktion .....	33
3.5.2.1 Zelluläre Gesamtproteinextraktion .....	34
3.5.2.2 Cytosolische und nukleäre Proteinextraktion.....	34
3.5.3 Westernblot .....	35
<b>3.6 Bildbearbeitung .....</b>	<b>37</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Basisdaten IPP .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Basisdaten Kontrollkollektiv.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Ergebnisse der RT-PCR .....</b>	<b>39</b>
<b>4.4 Ergebnisse der Immunofluoreszenz-Mikroskopie .....</b>	<b>40</b>
4.4.1 Fibroblastennachweis.....	40
4.4.2 Immunocytologische Zeitreihen-Stimulation .....	41

4.4.2.1 Stimulation mit TGF-beta-1 .....	41
4.4.2.2 Stimulation mit BMP-2 .....	46
<b>4.5 Westernblot-Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
4.5.1 Qualitätskontrolle cytosolisch/nukleäres Extrakt .....	50
4.5.2. Zeitreihen-Stimulation .....	51
4.5.2.1. Stimulation mit TGF-beta-1 .....	51
4.5.2.2 Stimulation mit BMP-2 .....	52
4.5.2.3. Stimulation mit IFN-gamma .....	53
4.5.2.4. Vergleich mit dermalen Fibroblasten .....	54
4.5.3 Co-Stimulation.....	56
4.5.3.1. Stimulation mit TGF-beta-1 und IFN-gamma .....	57
4.5.3.2. Stimulation mit BMP-2 und IFN-gamma .....	59
4.5.3.3. Vergleich mit dermalen Fibroblasten .....	60
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>62</b>
5.1 Basisdaten IPP und Kontrollkollektiv .....	62
5.2 Zellkultur.....	63
5.3 RT-PCR .....	64
5.4 Mikroskopie.....	64
5.4.1 Morphologie .....	64
5.4.2 Immunofluoreszenz-Mikroskopie.....	65
5.4.2.1 Fibroblastennachweis .....	65
5.4.2.2 Smads .....	65
5.5 Westernblot.....	66
5.5.1 Zeitreihen-Stimulation mit TGF-beta-1, BMP-2 und IFN-gamma .....	66
5.5.2 Co-Stimulation mit IFN-gamma .....	68
5.5.3 Vergleich mit dermalen Fibroblasten .....	69
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>71</b>
<b>7. Englische Zusammenfassung (Summary) .....</b>	<b>74</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>9. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>10. Publikationen.....</b>	<b>90</b>
10.1 Originalarbeiten: .....	90
10.2 Übersichtsarbeiten: .....	90
10.3 Abstracts: .....	90
<b>11. Erklärung.....</b>	<b>92</b>
<b>12. Danksagung.....</b>	<b>93</b>
<b>13. Lebenslauf .....</b>	<b>95</b>

### 1. Einleitung und Fragestellung

Die Induratio penis plastica (IPP), im angelsächsischen Raum „Peyronie’s disease“ genannt, ist eine Erkrankung der penilen Tunica albuginea mit Bildung eines fibrotischen, teilweise im fortgeschrittenen Stadium verkalkten Plaque [98, 119, 122].

Die IPP tritt überwiegend ab dem 50. Lebensjahr auf, sie betrifft ca. 0,4–3,2% der männlichen Bevölkerung [6, 19, 52, 69]. An Symptomen fällt neben der Plaquebildung und eventuell bestehenden penilen Schmerzen in der Regel zuerst eine bei Erektion bestehende Penisdeviation auf. Je nach Ausprägung der Deviation ist dadurch die Ausübung von Geschlechtsverkehr beeinträchtigt oder unmöglich. Häufig kommt im fortgeschrittenen Stadium eine erektile Dysfunktion hinzu [122]. Die Erkrankung stellt für den Patienten eine hohe psychische Belastung und Einschränkung der Lebensqualität dar [96].

Die Diagnose kann aufgrund einer ausführlichen Anamnese, Palpation und Sonographie des Penis sowie Photographie des erigierten Gliedes gestellt werden [4, 38, 55].

Der Erfolg der medikamentösen Therapie bleibt meistens aus. Alternative wenig invasive Therapieansätze wie die medikamentöse Infiltration des Plaques oder die extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) zeigen nur geringe Erfolgsraten. Eine operative Penisschaftbegradigung kann nur in der stabilen Erkrankungsphase durchgeführt werden. Sie wird von vielen Patienten aus Angst vor Komplikationen und/oder einer möglichen postoperativen Penisverkürzung abgelehnt [90, 110].

Die Ursachen der IPP sind bislang noch nicht ausreichend erforscht, die genaue Pathogenese ist noch unklar. Forschungsergebnisse zur Ätiopathogenese der IPP sind für die Entwicklung neuer Therapieansätze erforderlich.

In der Literatur wurden traumatische, mikrotraumatische, genetische, (auto-) immunologische, entzündliche, degenerative und medikamentöse Ursachen diskutiert [39, 45, 50]. Am häufigsten wird die Hypothese der wiederholten Mikrotraumen diskutiert [18]. Durch Abknickung des Penis beim Geschlechtsverkehr kommt es zu Einrissen in der Tunica albuginea mit einer nachfolgenden Entzündungsreaktion und schließlich zu exzessiven Kollagen- und Fibrinablagerungen mit Plaquebildung [18, 71].

## 1. Einleitung und Fragestellung

Im Plaque-Gewebe der penilen Tunica albuginea sind bei Patienten mit IPP erhöhte Werte von Transforming Growth Factor beta (TGF-beta) und Interferon-gamma (IFN-gamma) beschrieben [27]. Daraus leiten sich folgende Fragestellungen ab:

Besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Erhöhung der Cytokine und Bildung des Plaque?

Gibt es auf zellulärer, Protein- und/oder RNA-Ebene Unterschiede bezüglich der TGF-beta -Signaltransduktionskette zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe?

Kann durch Interferon-gamma die fibromodulierende Wirkung von TGF-beta inhibiert werden?

## 2. Grundlagen

### 2.1 Induratio penis plastica

#### 2.1.1 Historie

Bekanntester Beschreiber der Induratio penis plastica ist zweifellos Francois Gigot de LaPeyronie (1678-1747). Nach ihm wird die Erkrankung im angelsächsischen Raum noch heute Peyronie's disease benannt [40,82]. Er grenzte 1743 die IPP von venerischen Erkrankungen ab und erstellte einen Bezug zur sexuellen Aktivität [57].

Bereits 1267 beschrieb Theoderich in Bologna penile „harte Tuberkel“, die zur erektilen Dysfunktion führen [82]. Vesalius (1514-1564) und Fallopius (1523-1562) beschrieben 1561 und 1564 in Anatomiebüchern den gleichen Mann mit nicht schmerzhaften Ganglien oder Drüsen am Penis, die bei Erektion zu einer Verbiegung ähnlich des Horns eines Widders führen [57].

Im 50. Kapitel seines Werkes „Tumores prater naturam“ beschreibt der Anatom Arantius (Giulio Cesare Aranzi 1530-1589) einen bohnenähnlichen penilen Tumor bei Männern mit exzessiver sexueller Aktivität, die bei Erektion zu einer Deviation führt [40].

Mehr als ein Jahrhundert nach LaPeyronie's Beschreibung entdeckt van Buren 1874 die Erkrankung neu und veröffentlicht im „New York Medical Journal“ eine Symptomenbeschreibung. Vorübergehend wird in der USA die IPP „Van Buren's disease“ genannt. [82]

Aus der Kulturgeschichte des antiken Griechenland sowie der Yagua Indianer im Amazonas sind phallische Symbole bekannt, die teilweise eine penile Deviation aufweisen. Sie wurden als Amulett um den Hals getragen oder vor Tempeln aufgestellt und sollten die Erektionsfähigkeit verbessern [57].

#### 2.1.2 Epidemiologie und assoziierte Erkrankungen

An der Induratio penis plastica sind je nach Literaturangaben ca. 0,3-4% der männlichen Bevölkerung erkrankt. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 5. und 6. Lebensjahrzehnt [69, 84, 88, 109]. Durch Autopsie wurden in 23% der Männer eine zumindest milde Ausprägung der IPP gefunden [104].



## 2. Grundlagen

Die Erkrankung scheint assoziiert zu sein mit Fibromatosen (Dupuytren'schen Kontraktur, M. Ledderhose) [36] und metabolischen Störungen (Diabetes mellitus, Gicht) sowie der Einnahme von  $\beta$ -Blockern [63, 113, 114].

### 2.1.3 Klinik

Es kann ein Früh- und ein Spätstadium unterschieden werden. Bei Beginn besteht häufig eine Symptomentrias aus Penisdeviation, Plaquebildung und penilen Schmerzen [32, 34, 54].

Bei 52% der Männer besteht als erstes Symptom eine penile Deformität bei der Erektion [86]. Diese imponiert meistens als nach dorsal gerichtete Penisdeviation in einem Ausprägungsgrad von 20-135° [9, 122], zum Teil mit sanduhrähnlicher Einschnürung oder schwanenhalsartiger Deformität [29, 122]. Häufig tritt eine distale Flaccidität auf [43]. Bei ca. 30% der Betroffenen besteht zusätzlich eine erektile Dysfunktion [122].

Der Plaque ist in der Regel dorsal palpabel [98]. Penile Schmerzen als Zeichen eines aktiven Entzündungsprozesses bestehen bei 50-70% der Patienten im ersten Erkrankungsjahr [9, 122]. Bei fortbestehender Erkrankung kommt es häufig zur Verkalkung des Plaques und einer Penisschaftverkürzung.

Insbesondere in den ersten zwölf Monaten kann es zu natürlichen Schwankungen im Krankheitsverlauf kommen. Gelbard et al. beschreiben bei 13% der Patienten eine spontane Rückbildung von Deviation und Plaque, bei 47% einen unveränderten Befund, bei 40% kam es innerhalb eines 5-jährigen Beobachtungszeitraumes zu einer Progression [34]. Nach anderen Angaben kann es bei einem Viertel der Patienten im Anfangsstadium zu einer spontanen Heilung kommen [17, 124]. Besteht die Erkrankung seit über 2 Jahren, existiert zusätzlich ein M. Dupuytren, ist der Plaque bereits kalzifiziert oder die Penisdeviation größer 45°, sind dies negative Prognosefaktoren für eine spontane Heilung [36].

## 2. Grundlagen

### 2.1.4 Diagnostik

Die Diagnostik stützt sich vor allem auf die ausführliche Anamneserhebung. Sie evaluiert Entstehungszeitpunkt, Dauer der Erkrankung, Vorhandensein von penilen Schmerzen in Ruhe oder bei Erektion. Ergänzend wird nach erektiler Dysfunktion, Ausübbarkeit von Geschlechtsverkehr sowie Ausprägung der penilen Deviation und Ausrichtung sowie assoziierten Erkrankungen gefragt [7, 39]. Wichtig für die Festlegung der Therapie ist, ob sich die Erkrankung in einer stabilen Phase befindet, das heißt, daß seit mindestens 6 Monaten weder penile Schmerzen bestehen noch eine Veränderung der Deviation aufgetreten sind [123]. Es schließt sich an die Anamnese die körperliche Untersuchung an. Bei leicht gestrecktem Penis kann meistens ein Plaque palpiert werden. Es werden Lage, Ausdehnung und Anzahl der Plaque festgehalten [38].

Mittels der Sonographie im penilen Längs- und Querschnitt kann mit einer 7,5-10 MHz Sonde zu 100% eine Verkalkung des Plaques diagnostiziert werden [2, 96, 119]. Der unverkalkte Plaque ist schwer zu schallen und imponiert als Verdickung der Tunica albuginea. Die Sonographie gilt zusammen mit der Palpation als Goldstandard zur Diagnostik der IPP [43].

Computertomographie und Kernspintomographie sind sehr teuer und bringen für den Kliniker keine wesentlichen zusätzlichen Informationen, sie sind nur von wissenschaftlichem Interesse [91].

Um das Ausmaß der Penisdeviation bestimmen zu können, ist eine Photographie des Penis im erigierten Zustand sinnvoll. Diese kann von den Patienten als Autophotographie in der Technik nach Kelâmi (von oben, frontal und seitlich) mitgebracht [55, 56] oder vom Arzt nach einem Schwellkörperinjektionstest (SKAT-Test) durchgeführt werden. Dabei wird eine vasoaktive Substanz, z.B. 10µg Prostaglandin E<sub>1</sub>, in die Corpora cavernosa zur Auslösung einer artefiziellen Erektion injiziert. Eine Kombination mit der Farbduplexsonographie zur Ermittlung des arteriellen Gefäßstatus ist sinnvoll [59, 122].

Die dynamische Infusionspharmakokavernosographie und -kavernosometrie (DICC) als invasiver diagnostischer Eingriff wird nur bei ausgeprägter IPP vor großen Korrektureingriffen (z.B. Small Incision mit Graft) durchgeführt [39]. Röntgenologisch werden die Corpora cavernosa und das Venensystem dargestellt, Informationen über kavernöse Verschlußmechanismen bei veno-okklusiver Dysfunktion können qualitativ beurteilt werden [36, 39].

## 2. Grundlagen

Differentialdiagnostisch muß vor allem bei jüngeren Patienten und schnellem Progreß der Erkrankung an das sehr seltene penile Epitheloid-Sarkom gedacht werden [46, 112]. Die sklerosierende Lymphangitis ist eine oberflächliche am Sulcus coronarius lokalisierte Läsion, sie tritt bei exzessivem Geschlechtsverkehr und wiederholtem penilem Trauma auf. Eine thrombosierte Vene kann bei der Untersuchung getastet werden, sie bildet sich oft nach sexueller Karenz wieder zurück [38]. Schwellkörperfibrosen treten nach SKAT-Therapie, Priapismus, Cavernitis oder Penisfrakturen auf. Genuine Penisdeviationen sind angeboren und meistens nach ventral gerichtet. Deviationen werden auch bei Hypospadie, beim urethralen Manipulationssyndrom oder nach Penistraumen beschrieben [39].

### 2.1.5 Therapie

Da die exakte Ätiopathogenese der IPP bislang noch ungeklärt ist, gibt es bislang keinen kausalen Therapieansatz. Medikamentöse und andere konservative Therapieformen sind häufig wenig effizient.

Ein medikamentöser Therapieversuch scheint nur im akuten entzündlichen Anfangsstadium sinnvoll [81, 91]. Die Einnahme von Potassium-Para-Aminobenzoat (Potaba®) soll einen protektiven Effekt auf die Weiterentwicklung der Erkrankung haben, indem es eine abnormale Fibroblasten-Proliferation inhibiert und die Plaquegröße vermindert. Das Medikament muß mindestens über einen Zeitraum von 6 Monaten eingenommen werden in einer Dosierung von 12g/Tag [120, 121]. Bislang existiert nur eine placebo-kontrollierte, doppelblinde Studie, in der im Vergleich zum Placebo keine signifikante Wirkung nachgewiesen werden konnte [101].

Die Wirkung des Antioxidans Vitamin E konnte in einer doppelblinden Follow-up Studie ebenfalls nicht bestätigt werden. Da diese Therapie preisgünstig und nebenwirkungsarm ist, wird sie häufig angewandt [85].

Die intraläsionale Infiltrationstherapie mit diversen Präparaten (Verapamil, Tamoxifen, Interferon-alpha) [11, 20, 21, 41, 62, 68, 91] erfordert eine gute Patienten-Compliance. Sie wird in der Regel 2-wöchentlich über einen Zeitraum von 12 Wochen durchgeführt [91]. Gesicherte Daten zur Wirksamkeit dieser Substanzen fehlen bislang [20, 21, 76].

## 2. Grundlagen

Die Iontophorese wird mit einer Kombination aus Verapamil, Lidocain und Dexamethason im Frühstadium der Erkrankung durchgeführt. Sie führt in 96% zu einer penilen Schmerzlinderung [92]. Sowohl bei der intraläsionalen Infiltrationstherapie als auch bei der oralen Therapie scheint der Erfolg nicht über den Placebo-Effekt beziehungsweise den natürlichen Krankheitsverlauf hinauszugehen.

Ist der Plaque bereits verkalkt, ist eine medikamentöse Therapie nicht mehr erfolgsversprechend. Es kann ein Heilversuch mit der extrakorporalen Stoßwellentherapie (ESWT) durchgeführt werden. Die Langzeitergebnisse sind eher enttäuschend [48, 75, 91]. Lediglich der penile Schmerz vermindert sich in 85% [49, 83].

Eine operative Penisschaftbegradigung wird nur in der stabilen Phase der Erkrankung durchgeführt, um zu verhindern, daß es postoperativ durch einen erneuten Schub zur neuen Deviation beziehungsweise Verschlechterung kommt. Die Erkrankung muß seit mindestens 12 Monaten bestehen. Es dürfen in den vergangenen 6 Monaten weder penile Schmerzen bestanden haben noch darf sich die Deviation verändert haben [39]. Bei einer Penisdeviation  $<60^\circ$  wird eine Penisschaftbegradigung in der Technik nach Essed-Schroeder oder Nesbit durchgeführt [13, 39, 42, 65, 66, 96, 115], dabei kommt es zu einer Penislängenverkürzung um 1-2mm pro  $10^\circ$  Deviation [39]. Bei ausgeprägter dorsaler Deviation  $>60^\circ$  wird eine Small-Incision mit Graft-Interponat empfohlen [10, 33, 39, 67, 98]. Bei dieser Technik ist die Gefahr der postoperativen erektilen Dysfunktion höher [10, 12]. Schlechte Langzeitergebnisse traten beim Ausfräsen des Plaques auf. Diese Technik wird daher nicht mehr durchgeführt. Bei additiver, auf konservative Therapie refraktärer, erektiler Dysfunktion kann eine hydraulische Penisprothese, ggf. mit zusätzlicher Corporoplastik, implantiert werden [37, 77].

### 2.1.6 Ätiopathogenese

Die genaue Ätiopathogenese der IPP ist noch nicht geklärt. Es werden verschiedene Ansatzpunkte diskutiert. Eine Assoziation zwischen Penistrauma und IPP wird vermutet [5, 35, 124]. Am häufigsten wird die Hypothese der rezidivierenden Mikrotraumen diskutiert. Durch dorsales Abknicken des Penis bei der Kohabitation oder bei nächtlichen Erektionen in Bauchlage können Bindegewebssepten der Tunica albuginea einreißen. Es kommt zur

## 2. Grundlagen

Hämatombildung innerhalb der Tunica mit Auslösung einer entzündlichen Reaktion. Nach der Ausheilung mit exzessiver Kollagen- und Fibrinablagerung entsteht eine Fibrose [39, 93].

Ein gehäuftes Vorkommen spezieller HLA-Varianten, insbesondere HLA-B27 [89], HLA-A1, HLA-DQw2 [94] und DR3 [95] wurde in älteren Arbeiten beschrieben [35, 45, 50, 124], in einer aktuellen Studie jedoch ausgeschlossen [45].

Schiavino et al. fand bei 75,8% der IPP-Patienten mindestens einen pathologischen immunologischen Parameter und vermutet Alterationen in der zell-vermittelten Immunantwort [35].

Peyronie beschrieb als Ursache eine venerische Infektion [15]. Er ging davon aus, daß die Erkrankung insbesondere bei sexuell aktiven Männern auftritt. In einer anderen Studie wird sie vor allem bei sexuell Frustrierten beschrieben. Nach neueren Studien ist eine gonorrhoeische Urethritis als Ursache eher unwahrscheinlich [5, 93]. Eine Antikörper-Reaktion gegen bakterielle Antigene wurde als Auslöser der IPP diskutiert [123], in einer neuen Studie konnte jedoch keine 16S rDNA als Marker für bakterielle Präsenz im Plaque nachgewiesen werden [47]. Eine entzündliche Reaktion in der Frühphase der IPP läßt sich nachweisen. Subtunical besteht eine vermehrte Infiltration von T-Lymphozyten und Makrophagen. Im Serum lassen sich erhöhte Spiegel von antinukleären Antikörpern und Rheumafaktoren sowie eine Hypergammaglobulinämie nachweisen [39].

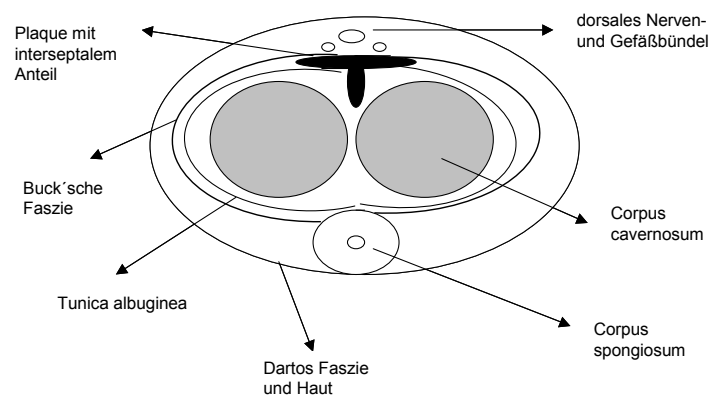
Ferner wurden für die Entstehung der IPP degenerative Ursachen [124], Medikamenteneinnahme (Beta-Blocker und Barbiturate) [29, 50], erhöhte Serotoninspiegel [5, 50] und Vitamin-E-Mangel [29, 50] diskutiert.

### 2.1.7 Morphologie

Es wird ein Frühstadium mit einer aktiven Entzündung zwischen Tunica albuginea und den Corpora cavernosa von einem Spätstadium mit einem erhöhten Fibroblastenvorkommen in der gesamten Tunica albuginea des Penis unterschieden [98]. Der Plaque geht von der Tunica albuginea aus und reicht an die Buck'sche Faszie heran (**Abbildung 1**). Dort sind beim Gesunden keine elastischen Fasern nachweisbar [5].

## 2. Grundlagen

Das Frühstadium der IPP ist durch eine entzündliche perivaskuläre Infiltration der Tunica albuginea und des subtunicalen Bindegewebes durch T- und B-Lymphozyten gekennzeichnet. Dieser Reaktion folgt die Aktivierung der Fibroblasten [14, 103, 104] und infolge die Umstrukturierung des betroffenen Gewebes. Zunächst entsteht eine erhöhte Fibrindepotion [8, 107, 116], dann eine exzessive Kollagenanreicherung, insbesondere vom Typ I und III [8, 14, 108, 117]. Gleichzeitig tritt ein Verlust an elastischen Fasern auf [8, 14, 53]. Im Laufe der Erkrankung kommt es bei 30% der Patienten zur Kalzifizierung des Plaques, die meistens perivaskulär entsteht [14, 117, 118].



**Abbildung 1 zeigt eine Schemazeichnung zum anatomischen Penisquerschnitt. Der IPP-Plaques befindet sich zwischen Tunica albuginea und Buck'schen Faszie.**

### 2.1.8 Genetik und Immunologie

Bei bis zu 30% der Patienten mit IPP besteht gleichzeitig ein M. Dupuytren [36, 39, 95]. Eine genetische Disposition wurde in zahlreichen Studien vermutet. Ein gehäuftes Auftreten des Kreuzreaktionsantigens der HLA-I-Gruppe B7 wurde von Wilscher et al. beschrieben [125]. Rempel et al. stellte einen signifikanten Bezug zum HLA-System I und II fest, die Antigene A1 und DQw2 beziehungsweise in einer weiteren Studie DQw2 und DR3 traten vermehrt auf [94, 95]. In einer Arbeit von Leffell et al. wurde kein Bezug zu den Antigenen A, B und C des HLA-I-Systems festgestellt [64]. Bei einem großen Patientenkollektiv von 154 Patienten

## 2. Grundlagen

konnte von Hauck et al. kein signifikanter Unterschied im HLA-System I und II im Vergleich zum Kontrollkollektiv nachgewiesen werden [44].

Während des Erkrankungsprozesses kommt es zum Umbau der Tunica albuginea und der subtunicalen Schichten mit Zunahme von Kollagen Typ I und III und Verlust der elastischen Fasern [8, 14, 108, 117]. Insbesondere bei den Patienten mit additiver erektiler Dysfunktion nimmt die Konzentration der elastischen Fasern in der Tunica albuginea signifikant ab. Antikörper gegen Elastin sind bei allen Menschen nachweisbar, jedoch sind die Spiegel von Antitropoelastin und Anti-alpha-Elastin bei IPP-Patienten exzessiv erhöht. Dies läßt eine Autoimmunreaktion als möglichen Pathogenesefaktor der IPP vermuten [50]. Cytokine als Signaltransduktoren greifen steuernd in den Ablauf von immunologischen Zellkooperationsschritten ein. Im peripheren Blut von Patienten mit IPP wurden erniedrigte Spiegel von Fibroblast Growth Factor basis (bFGF), Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) und Interleukin-6 gefunden. Dies sind Marker für die Fibroblastenproliferation, Kollagensynthese und Blutgefäßbildung [31]. Die Akuten-Phase-Proteine zeigten für C-reaktives Protein (CRP) leicht erhöhte, für alpha-1-Antitrypsin und alpha-2-Makroglobulin erniedrigte Serumspiegel im Vergleich zum Kontrollkollektiv [31].

Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) wirkt als Mediator bei der Kollagensynthese und Fibrose mit [50]. Im Gewebe der Tunica albuginea bei IPP-Patienten wurde eine erhöhte Expression von TGF-beta-1 in 86%, von TGF-beta-2 in 23% und TGF-beta-3 in 17% durch El-Sakka et al. beschrieben. In der Kontrollgruppe ließ sich nur bei einem Patienten eine singular erhöhte TGF-beta-1 Expression nachweisen [27]. Bei einem Tiermodell wurden durch subtunicale Injektion von Cyto modul in eine TGF-beta-Expression und IPP-typische histomorphologische Veränderungen nachgewiesen [28]. In einem weiteren Tiermodell erfolgte die TGF-beta-Injektion in die Tunica albuginea des Rattenpenis. Nachfolgend wurde eine erhöhte Produktion von Kollagen I und III nachgewiesen [87].

### 2.2 Cytokin-Signaltransduktion

Cytokine und Wachstumsfaktoren sind Mediatoren, die nach Bindung an spezifischen Rezeptoren eine Signaltransduktionskette auslösen, an deren Ende

## 2. Grundlagen

die veränderte Transkription von mRNA und in Folge die Translation zu spezifischen Proteinen steht.

In der Pathogenese der IPP sind Wachstumsfaktoren der TGF-beta-Superfamilie von entscheidender Bedeutung. Zu dieser Familie gehören neben den TGF-beta's auch die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) und Aktivine. Als bedeutendster Antagonist von TGF-beta induzierter Signaltransduktion gilt das Interferon-gamma, welchem in klinischen Lungenfibrose-Studien eine antifibrotische Wirkung nachgewiesen wurde.

### 2.2.1. Transforming-Growth-Factor-beta (TGF-beta)

Zur Transforming Growth Factor (TGF)-beta-Superfamilie gehören über 30 Mitglieder, u.a TGF-beta, Bone morphogenetic proteins (BMPs) und Activin. TGF-beta ist ein multifunktionelles Cytokin, das verschiedenste biologische Effekte wie Proliferation, Zelldifferenzierung, Embryonalentwicklung, Migration und Apoptose beeinflusst und einen Beitrag zur Modulation der Immunantwort beiträgt [23, 30, 72]. Es existieren 3 Isoformen von TGF-beta. TGF-beta-1 mRNA wird in endothelialen, hämatopoetischen und Bindegewebszellen exprimiert, TGF-beta-2 mRNA in epithelialen und neuronalen Zellen, TGF-beta-3 primär in mesenchymalen Zellen [30].

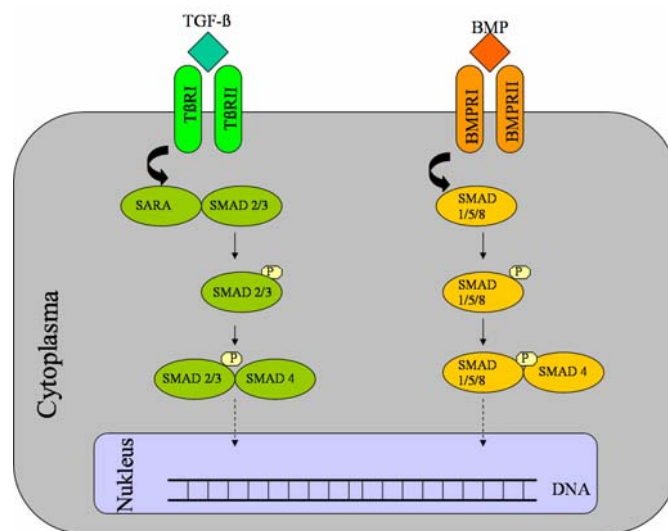
TGF-beta steht im Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen, insbesondere Atherosklerose und Fibrose von Lunge, Leber und Niere. Für die Pathogenese von Karzinomen und hereditäre hämorrhagische Teleangiektasien ist TGF-beta wichtig [30].

TGF-beta reguliert die Zellprozesse durch Bindung an spezifische Zelloberflächenrezeptoren, bekannt als TGF-beta-Rezeptor I, II und III. Rezeptor III hat eine nichtsignalübertragende Wirkung [30]. TGF-beta bindet zunächst an den zellmembranständigen TGF-beta-Rezeptor II. Diese Bindung induziert eine Heterokomplex-Formation zwischen TGF-beta-Rezeptor II, TGF-beta-Rezeptor I und TGF-beta, welches die Phosphorylierung von TGF-beta-Rezeptor I durch die konstitutiv aktive Kinase TGF-beta-Rezeptor II induziert. Der aktivierte Rezeptorkomplex löst eine Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, den sogenannten Smads aus. Der Name Smad leitet sich von dem bei Drosophila gefundenen Protein MAD (Mothers against Decapentaplegic) und dem



## 2. Grundlagen

*Caenorhabditis elegans* Protein SMA (Small body size) ab. Diese Reaktion wird bei Smad2/3 durch die Interaktion von SARA (Smad anchor for receptor activation) vermittelt. Von den 10 bekannten Smads werden durch den TGF-beta-Rezeptor I Smad2 und 3 aktiviert. An die phosphorylierten Transkriptionsfaktoren bindet Co-Smad4. Der Komplex transloziert in den Nukleus und interagiert dort mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren zur Regulation der Transkription [23, 30, 72, 74, 126]. Die komplexe Signaltransduktionskette ist vereinfacht in **Abbildung 2** dargestellt.



**Abbildung 2 zeigt vereinfacht die Signaltransduktionskette von TGF-beta und BMP. Nach Bindung der Cytokine an ihren Rezeptor werden die entsprechenden Smads phosphoryliert und mit Co-Smad4 verbunden. Der Komplex wandert dann in den Nukleus und löst die Transkription aus.**

Die Regulation der TGF-beta-Signaltransduktion ist hoch kompliziert und erfolgt sowohl auf der Prä-Rezeptor-, als auch auf der Post-Rezeptor-Ebene [74]. Dieses Netzwerk ist in **Abbildung 3** dargestellt.

Von den 10 bekannten Smads sind Smad6 und 7 Inhibitoren (I-Smads). Sie inhibieren die Bindung von Rezeptor-Smads an die phosphorylierten Rezeptoren und somit deren Aktivierung und Translokation in den Nukleus [16, 74, 102]. Durch Feedback-Mechanismen aktiviert Smad2 für die TGF-beta-Transduktionskette die Inhibitoren-Smads6 und 7, das gleiche gilt für Smad1 für den BMP-

## 2. Grundlagen

Transduktionsweg. Eine crosstalk-Kontrolle erfolgt unter anderem durch Interferon-gamma (IFN-gamma), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) und Epidermal Growth Factor (EGF).

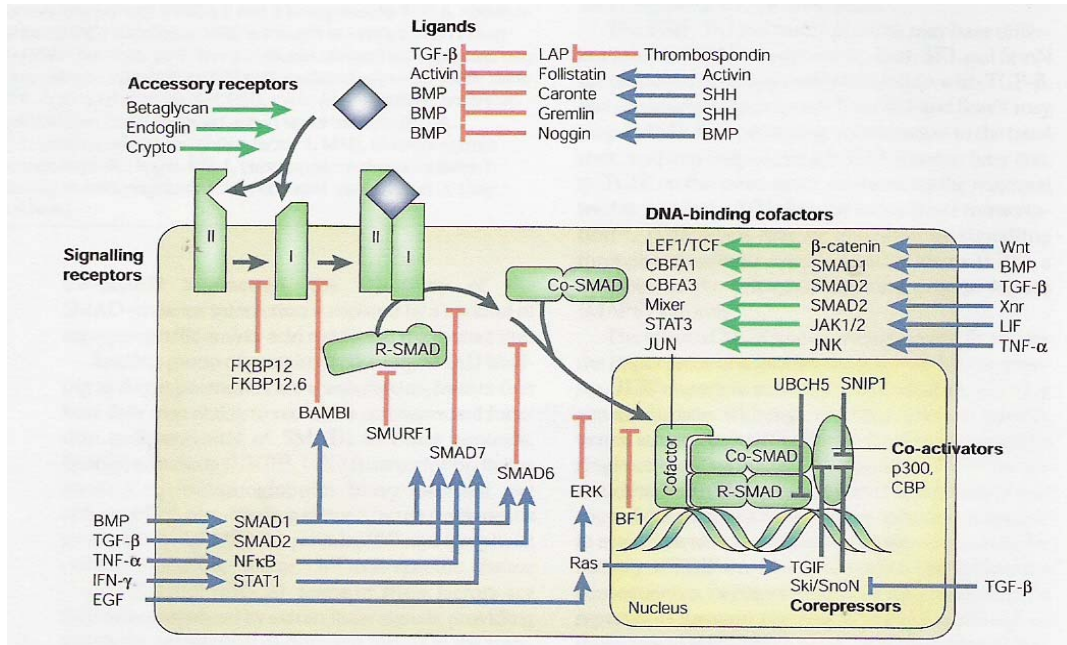


Abbildung 3 zeigt das komplexe Netzwerk der Regulation der TGF-beta-Signaltransduktion. Die roten Pfeile zeigen die direkte Inhibition, blau sind die Agonisten dargestellt, grün die verstärkend wirkenden Co-Faktoren. (nach Massagué [74])

### 2.2.2 Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Bone Morphogenetic Proteine (BMPs) gehören zur TGF-Superfamilie. Die Signaltransduktion (siehe **Abbildung 2**) ähnelt der von TGF-beta. Initiiert wird die Kette durch Bindung des BMP Liganden an die verwandten BMP-Rezeptoren I und II. Die durch Ligandenbindung aktivierte BMPRII-Kinase transphosphoryliert die Typ-I-Rezeptor-Kinase, die wiederum die Smads1,5 und 8 phosphoryliert. Nach Komplexbildung mit Co-Faktor Smad4 transloziert der Transkriptionsfaktor in den Nukleus und kann die Transkription auslösen [16, 24, 25].

## 2. Grundlagen

### 2.2.3 Interferon-gamma

Interferon-gamma (IFN-gamma) ist ein Cytokin mit pleiotroper Wirkung auf verschiedene Zelltypen. Es inhibiert die TGF-beta induzierte Phosphorylation von Smad2/3, die für die Bindung an SMAD4 notwendig ist. Nur der Smad2/3-Smad4-Komplex ist in der Lage in den Nukleus zu translozieren. Die Inhibition erfolgt durch IFN-gamma-induzierte Expression des inhibitorisch wirkenden Smad7 (s. **Abbildung 3**). IFN-gamma kann sowohl die Fibroblasten-Proliferation als auch die Kollagen-Synthese, induziert durch TGF-beta, supprimieren [23, 61, 111].

Interferon-gamma wirkt über die JAK- (janus kinase) /STAT- (signal transducer and activator of transcription) Transduktionskette. STAT wird phosphoryliert, verbindet sich mit einem weiteren phosphorylierten STAT-Molekül und wandert in den Zellkern. Es resultieren erhöhte Spiegel von Smad7, die mit der TGF-beta-Rezeptor-Phosphorylierung von Smad3 interferieren und den Smad Signalweg inhibieren [74].

### 3. Patienten und Methoden

#### 3.1 Patientenakquisierung

##### 3.1.1 Patienten mit IPP

In die Studie wurden Patienten mit IPP eingeschlossen, die sich an der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Justus-Liebig-Universität Giessen einer operativen Penisschaftbegradigung unterzogen. Einschlusskriterium war die Diagnose der Induratio penis plastica, die anamnestisch, palpatorisch und sonografisch verifiziert wurde. Zusätzlich wurde bei allen Patienten ein SKAT-Test mit Duplexsonographie und Photographie des erigierten Penis zur Dokumentation des Ausprägungsgrades der Deviation und des Erektionsgrades durchgeführt. Bei den Patienten mit einer Penisdeviation  $<60^\circ$  wurde in der Regel eine operative Penisschaftbegradigung in der Technik nach Essed-Schroeder durchgeführt. Auf der der Deviation gegenüberliegenden Seite wird das Gewebe durch Plikaturnähte zusammengerafft und der Penis dadurch begradigt. Bei den Patienten mit einer Deviation  $>60^\circ$  wurde bevorzugt eine Small Incision mit Graft-Interponat durchgeführt. Nach Präparation und Abheben des Gefäßnervenbündels nach dorsal wird der Plaque inzidiert und mit einem Graft gedeckt.

Im Rahmen der OP-Aufklärung wurden die Patienten darüber informiert und aufgeklärt, daß eine neben der zur Histologie-Sicherung erforderlichen Gewebprobe eine weitere für die Studie entnommen wird. Die in die Studie eingeschlossenen Patienten erklärten sich dazu bereit. Die Studien wurden im Vorfeld von der Ethik-Kommission (Antrags-Nr. 16/99 und 12/03) genehmigt.

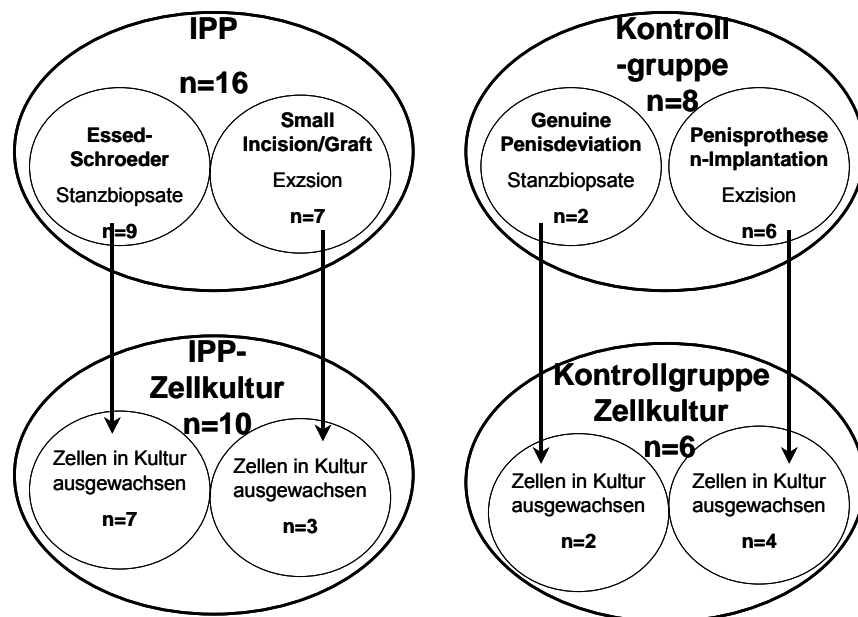
Intraoperativ wurde bei 9 Patienten, die nach Essed-Schroeder operiert wurden Biopsate mittels Stanzgerät entnommen. Bei 7 Patienten, die eine Small Incision erhielten, wurde Gewebe am Schnittrand exzidiert (s. **Abbildung 4**). Das Gewebe wurde direkt aus der vom Plaque betroffenen Tunica albuginea entnommen und zum Transport ins Labor in sterile Gefäße mit physiologischer Kochsalzlösung gelegt.

### 3. Patienten und Methoden

#### 3.1.2 Kontrollgruppe

Das Kontrollkollektiv bestand aus Gewebe der Tunica albuginea von Männern, die nicht an IPP erkrankt sind. Es kamen zum einen Männer in Frage, die aufgrund einer genuinen Penisdeviation eine Penisschaftbegradigung in der Technik nach Essed-Schroeder erhielten, zum anderen Männer mit ausgeprägter erektiler Dysfunktion, denen eine hydraulische Penisprothese implantiert wurde. Die Patienten wurden über die Gewebeentnahme informiert und erklärten sich einverstanden. Patienten, die in ihrer Anamnese vor Jahren an einer IPP erkrankt waren, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Die Studie wurde im Vorfeld von der Ethikkommission (Antrags-Nr. 16/99 und 12/03) genehmigt.

Stanzbiopsate wurden bei 2 Patienten mit genuiner Penisdeviation entnommen, Exzidate bei 5 Patienten mit Prothesenimplantation. Mit dem Gewebe wurde auf gleicher Weise verfahren, wie bei IPP.



**Abbildung 4 zeigt die Zusammensetzung von Patienten- und Kontrollkollektiv sowie die Anzahl angewachsener Zellkulturen.**

### 3. Patienten und Methoden

#### 3.1.3 Dermale Fibroblasten

Als unabhängige Kontrolle wurden kommerzielle dermale Fibroblasten (NHDF-c; Cat.-No.: C-12300; CH-B 1091202.2; PromoCell; Heidelberg; Deutschland) verwandt. Die Fibroblasten stammten aus der Vorhaut.

#### 3.2 Anlegen von Zellkulturen

Die Gewebeentnahme erfolgte unter sterilen OP-Bedingungen aus dem IPP-Plaque beziehungsweise beim Kontrollkollektiv aus der Tunica albuginea. Die Proben wurden in ein steriles Gefäß gegeben. Als Transportmedium wurde sterile physiologische Kochsalzlösung verwendet.

Im Labor wurde umgehend eine Zellkultur angelegt. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen das Gewebe in ca. 1 mm große Stücke geschnitten, auf ein bis zwei 100 mm Petrischalen gleichmäßig verteilt und mit 1x PBS (phosphated buffered saline) (Gibco™, Invitogen Corporation, UK, Cat-no:14200-067 und Dulbecco's phosphated buffered saline, PAA Laboratories, Pasching, Austria) beträufelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Anschließend wurde Kulturmedium dazu gegeben und bei 37°C, 5,0% CO<sub>2</sub>, 20,1% O<sub>2</sub> und 87% Humidität inkubiert. Anfänglich wurde als Kulturmedium Smooth Muscle Cell Growth Medium 2™ (Promocell, Heidelberg, Germany, Cat.-No: C-39210) verwendet. Es enthält 5% Fetal Calf Serum (FCS), 50 µg/ml Gentamicin sowie 50 ng/ml Amphotericin B. Später wurde ISCOVE-Medium basal (Biochrom AG Berlin, Germany, Cat# F0465) unter Zusatz von 10% FCS (fetal calf serum), 1% L-Glutamin und 50 µg/ml Gentamicin benutzt. Alle 2-3 Tage wurde ein Mediumwechsel mit vorgewärmtem Medium durchgeführt. Sobald Fibroblasten aus dem Gewebe ausgewachsen waren, wurde das Gewebe vorsichtig entfernt. 1-2 Tage später wurden die Zellen in Kulturflaschen gesplittet.



**Abbildung 5 zeigt rechts im Bild Gewebe aus der Tunica albuginea der Kontrollgruppe. Es wachsen Fibroblasten aus. (Repräsentative Abbildung für alle Zellkulturen am Beispiel Kontrolle Kf)**

Zum Splitten der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1xPBS gewaschen, Trypsin auf die Zellen pipettiert und 1 min bei 37°C inkubiert. Durch Schlagen der Kulturflaschen/Petrischalen auf eine harte Unterlage lösten sich die Zellen. Dies wurde mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurde Kulturmedium auf die Zellen gegeben. Durch das enthaltende FCS wurde die durch Trypsin bedingte Lyse abgestoppt. Die gelösten Zellen wurden gleichmäßig auf mehrere Kulturflaschen verteilt. Am Tag nach dem Splitten wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Mikroskopisch wurde vor jedem Mediumwechsel eine Kontamination ausgeschlossen und überprüft, ob die Zellen die typische Fibroblastenmorphologie aufwiesen.

Ab der zweiten bis dritten Passage standen die Zellkulturen für weitergehende Experimente zur Verfügung. Sie wurden bis maximal zur zwölften Passage verwandt.

### 3.3. RNA-Nachweis

#### 3.3.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des RNeasy®Midi Kit von Quiagen (Hilden, Deutschland). Durch Kombination von hoch-selektiver Bindung an eine Silica-Gel-Membran und Zentrifugation nach Zugabe spezieller Elutionspuffer, wurden RNA-Sequenzen, länger als 200 bp, extrahiert.

#### 3.3.2 Reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz. Diese zu amplifizierende Sequenz wird anhand von einem Primerpaar festgelegt. Von diesen Oligonukleotiden ausgehend beginnt die Polymerase die DNA zu verlängern. Die PCR erfolgt in 3 Schritten: Denaturierung, Annealing und Extension. Im ersten Schritt, der Denaturierung, trennt sich durch Erhitzen des Reaktionansatzes auf 94°C die doppelsträngige DNA in 2 Einzelstränge. Jetzt können die Oligonukleotid-Primer an den entsprechenden Sequenzen binden. Dies wird als Annealing bezeichnet. Die Annealing-Temperatur ist für jedes Primerpaar unterschiedlich und hängt von der Primerlänge und der Anzahl der Basen Guanin und Cytosin ab. Von den Primern ausgehend verlängert die Taq Polymerase bei Anwesenheit ausreichender Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) aller 4 Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin in 5' nach 3'-Richtung die DNA-Stränge. Nach diesen 3 Schritten liegt wieder Doppelstrang-DNA vor. Deshalb beginnen diese Zyklen erneut. Sie werden 34fach wiederholt.

Die isolierte RNA wurde zunächst in cDNA mit Hilfe des Omniscript-Kits (Quiagen, Hilden, Deutschland) umgeschrieben. Zuerst wurde die RNA 5 min bei 65°C inkubiert um die Sekundärstrukturen zu glätten, dann 1 min auf Eis gestellt und anschließend kurz zentrifugiert. Der Ansatz wurde entsprechend **Tabelle 1** pipettiert und eine hot-start-PCR 60 min bei 37°C, 5 min bei 93°C, Kühlung auf 4°C laufen lassen.



### 3. Patienten und Methoden

Substanzen	Menge für 20µl - Ansatz
10x Puffer RT	2 µl
dNTP Mix	2 µl
Oligo-dt primer	2 µl
Omniscript TR	1 µl
RNAse free water	3 µl
RNA	10 µl

**Tabelle 1 zeigt den 20µl-Pipettieransatz der Reversen Transkription, dem Umschreiben von RNA in cDNA.**

Nach photometrischer Messung der cDNA-Konzentration (copy DNA) wird die Menge der cDNA ausgerechnet, die in die PCR eingesetzt werden soll.

Für die folgende PCR waren Primerpaare notwendig. Primer sind Oligonukleotide, die an bekannten DNA-Sequenzen ansetzen. Von hier aus kann die Polymerase die Sequenzen verlängern.

In der PCR sollte der Nachweis erbracht werden, ob sowohl bei den Patienten als auch beim Kontrollkollektiv die Transkriptionsfaktoren Smad1, 2, 3, 4, 5 und 7 vorhanden sind, beziehungsweise Isoformen auftreten. Die Primer für diese Smads stammen aus dem Labor von Oliver Eickelberg, Programmdirektor des Internationalen Graduierten Programms „Molecular Biology and Medicine of the Lung“, Medizinische Klinik II der Justus-Liebig Universität Giessen (**Tabelle 2**).

### 3. Patienten und Methoden

	<b>Vorwärts-Primer</b>	<b>Rückwärts-Primer</b>
<b>Smad1</b>	5' GGA GAC AGC TTT ATT TCA CCA TAT C 3'	5' CAA TAG TTT TCC AGA GGC AGA TG 3'
<b>Smad2</b>	5' GGG AGG TTC GAT ACA AGA GGC T 3'	5' GGA CCA CAC ACA ATG CTA TGA CA 3'
<b>Smad3</b>	5' AGC CAT GTC GTC CAT CCT G 3'	5' CTT CTT CTT GAC AAC AAT GGG 3'
<b>Smad4</b>	5' TTC ACT GTT TCC AAA GGA TCA AAA 3'	5' GTA GTC CAC CAT CCT GAT AAC GTT AAG 3'
<b>Smad5</b>	5' CTG TTC TTT CGG TAG CCA CTG AC 3'	5' GCA TTA TGA TTT CAG AAG ATA TGG GG 3'
<b>Smad7</b>	5' GAC TTC TTC ATG GTG TGC GG 3'	5' TAG TTT GAA GTG TGG CCT GCT C 3'
<b>HSC-70</b>	5' GCC CTT TAT GGT GGT GAA TGA 3'	5' CTT GTT CTC TTT TCC CGT ACT CTT 3'

**Tabelle 2: Oligonukleotid-Primer**

Für einen kompletten PCR-Ansatz ist die Zugabe von einem synthetisch hergestellten Oligonukleotid-Primerpaar, dem Vorwärts- und Rückwärts-Primer, der thermostabilen Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) und eines Mix aus Desoxyribonukleosidtriphosphate dATP, dGTP (Purinbasen Adenin und Guanin) dCTP und dTTP (Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin) notwendig.

Der Ansatz der PCR-Reaktion sowie die PCR-Bedingungen sind den **Tabellen 3-5** zu entnehmen.

### 3. Patienten und Methoden

Substanzen	Menge für 25µl - Ansatz
10x PCR-Puffer	2,5 µl
dNTP Mix	0,5 µl
50 mMol MgCl <sub>2</sub>	0,75 µl
Vorwärts-Primer	1 µl
Rückwärts-Primer	1 µl
cDNA	x µl abhängig von Konzentration, 240-500 ng
Platinum Taq	0,1 µl
RNAse free water	auf 25 µl ergänzen

**Tabelle 3: PCR-Pipettieransatz**

	Temperatur	Dauer	Zyklen
<b>Vorlauf</b>	94°C	3 min	
<b>Denaturierung</b>	94°C	30 sec	34
<b>Annealing</b>	57°C	30 sec	
<b>Polymerisation</b>	72°C	2 min	
	72°C	10 min	
<b>Stop</b>	4°C	∞	

**Tabelle 4: PCR-Bedingungen für Smads**

	Temperatur	Dauer	Zyklen
<b>Vorlauf</b>	94°C	3 min	
<b>Denaturierung</b>	94°C	30 sec	34
<b>Annealing</b>	60°C	30 sec	
<b>Polymerisation</b>	72°C	1 min	
	72°C	10 min	
<b>Stop</b>	4°C	∞	

**Tabelle 5: PCR-Bedingungen für HSC-70**

#### **3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Durch die Agarose-Gelelektrophorese wird die Auftrennung und Identifikation von DNA-Fragmenten möglich.

Agarose wurde durch Erhitzen in Gelelektrophorese-Puffer (1xTAE-Puffer: 40 mM Tris, 0,12% Essigsäure, 1 mM EDTA) gelöst und mit Ethidiumbromid (4 µl/ 100 ml Flüssigkeit) vermischt. Das Gel wurde auf einen Schlitten gegossen und einen Kamm für die PCR-Taschen eingefügt. Nach Erkalten entsteht eine besondere siebartig wirkende Proteinstruktur, die es ermöglicht, die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen.

Das PCR-Produkt wird mit Loading Buffer (0,25% Bromphenolblau, 40% Saccharose, 50 mM EDTA) gemischt, der Farbstoff dient sowohl der Markierung als auch erschwert das PCR-Produkt und sorgt für ein besseres Absinken in die Geltaschen. TAE-Laufpuffer (40 mM Tris, 0,12% Essigsäure, 1 mM EDTA) wurde in die Kammer über das Gel gegossen und bei 120 Volt ca. 60 min gestartet. Unter UV-Licht (322 nm) waren die Banden gut erkennbar und konnten zur Dokumentation gescannt werden (KODAK1D 3.5; Canon Digital Camera Twain Driver Version 5.00.8).

#### **3.4 Zelnachweis**

Zum Nachweis, daß es sich bei den kultivierten Zellen um Fibroblasten handelt, wurden die Zellen mit den Antikörpern alpha-Smooth-Muscle-Actin (Monoclonal Anti-alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4, Product No. A 2547; Sigma, Saint Lois, Missouri, USA) und Pancytokeratin (Monoclonal Anti-Pan Cytokeratin, Clone C-11, Product No. C 2931, Sigma, Saint Lois, Missouri, USA) gefärbt. Als zweiter Antikörper wurden FITC-markierte Anti-Maus-Antikörper verwendet (Zymax™, Goat-Anti-Mouse IgG, FITC-conjugate; San Francisco, California, USA). Anschließend wurde unter Fluoreszenzlicht mikroskopiert.

##### **3.4.1 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Die Zellkulturen wurden in „Chamber Slides“ (Falcon® Culture Slides, Becton/Dickinson, USA), mit abnehmbaren Kammern versehenen Objektträgern, geplittet. Am Tag nach dem Splitten wurden die Zellen entweder direkt fixiert oder

### 3. Patienten und Methoden

vorher mit TGF-beta-1 (1 ng/ml) oder BMP-2 (10 ng/ml) stimuliert. Die Fixierung erfolgte mit Methanol. Nach dem Waschen der Zellen mit kaltem 1xPBS wurde eiskaltes bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagertes Methanol auf die Zellen gegeben, diese 5 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert, anschließend das Methanol abgesaugt und erneut mit 1xPBS gewaschen.

Die Zellen wurden im nächsten Schritt mit 5% FCS 30 min geblockt, anschließend der entsprechende Antikörper (s. **Tabelle 1**), der mit 2% FCS 1:100 verdünnt wurde, auf die Zellen pipetiert und 60 min bei Raumtemperatur (RT) auf dem Schüttler inkubiert. Die Primärantikörper wurden abgesaugt, 3x mit 1xPBS gewaschen und für 60 min mit dem FITC-Sekundärantikörper (ZyMax<sup>TM</sup>, FITC-Conjugate, San Francisco, California, USA) inkubiert. Die Chamber Slides wurden mit Alufolie abgedeckt, da die FITC-Antikörper lichtempfindlich sind. Anschließend wurden die Antikörper abgesaugt und die Zellen mit 1xPBS gewaschen. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA), das die Zellkerne anfärbt, wurde mit 1xPBS 1:5000 verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit abgesaugt und erneut mit 1xPBS gewaschen. Nach gründlichem Absaugen wurde die Kammer von dem Objektträger entfernt, 1 Tropfen Mountmedium (gepuffertes Glycerol pH8,6, bestehend aus 1,5M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 1,5M  $\text{NaHCO}_3$ ) auf die Felder des Objektträgers pipettiert und ein Deckglas aufgelegt. Mit Nagellack wurden die Ränder abgedichtet. Sie waren jetzt im Kühlschrank haltbar. Mikroskopiert wurde mit einem Leica AS MDW Mikroskop bei 490 nm für die FITC-Antikörper, beziehungsweise 396 nm für DAPI bei einer 63fachen Vergrößerung (63x/1,30 Gly,  $n_e=1,460$ , Corr.  $37^{\circ}\text{C}$ ). Es wurde Glycerinlösung (Artikelnr. 11513872; Leica, Bensheim, Germany) aufgetragen.

Von 6 IPP-Zellkulturreihen und 3 des Kontrollkollektivs wurde eine Zeitreihen-Stimulation durchgeführt. Es wurden Chamber Slides 0, 15, 30 und 60 min mit TGF-beta1 beziehungsweise BMP-2 stimuliert (s. **Abbildung 6**). Anschließend erfolgte die Inkubation mit Antikörpern (s. **Tabelle 6**).

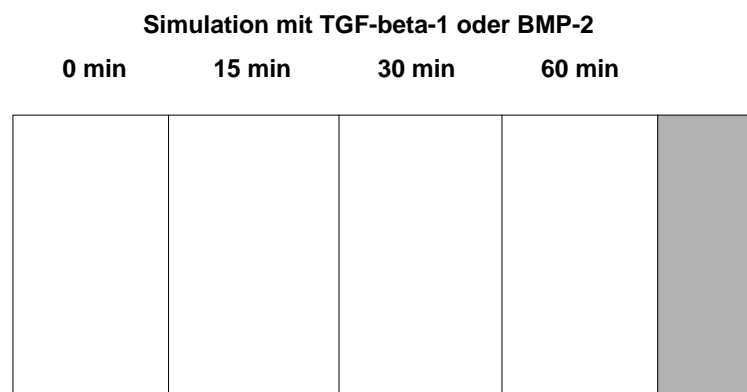
Jeweils 1 Chamber Slide pro Zellkulturlinie wurde nicht stimuliert und je eine Kammer mit alpha-Smooth-Muscle-Actin (alpha-SMA) und Pancytokeratin angefärbt. Damit konnte das Wachstum von Muskel- beziehungsweise Epithelzellen ausgeschlossen werden. Je eine Kammer wurde ohne Zusetzen des

### 3. Patienten und Methoden

Primärantikörper nur mit dem Sekundärantikörper, FITC-mouse (ZyMax™, San Francisco, California, USA) beziehungsweise FITC-rabbit (ZyMax™, San Francisco, California, USA) angefärbt. Dies diente zur Kontrolle.

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Firma	Klon
Smad1/2/3	FITC-mouse	Santa Cruz	H-2
Smad1	FITC-rabbit	Upstate	keine Angabe
Smad2/3	FITC-mouse	Transduction	18
Smad3	FITC-rabbit	Santa Cruz	FL-425
Smad4	FITC-rabbit	Santa Cruz	H-552
alpha-SMA	FITC-mouse	Sigma	1A4
Pancytokeratin	FITC-mouse	Sigma	C-11

**Tabelle 6 zeigt alle für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie verwandten Primär- und Sekundärantikörper.**



**Abbildung 6 zeigt die Zeitreihen-Stimulation der Chamber Slides mit TGF-beta beziehungsweise BMP-2.**

#### 3.5 Proteinnachweis

Die in Zellkulturen gewachsenen Fibroblasten wurden stimuliert, extrahiert, auf ein 10% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, auf eine Westernblot-Membran transferiert und mit Antikörpern inkubiert.

##### 3.5.1 Zellstimulation

Zur Stimulation der Zellen wurde TGF-beta-1 1 ng/ml, INF-gamma 50 ng/ml (Human TGF-beta-1 und Recombinant Human-IFN-gamma, R&D Systems, Inc.) und BMP-2 (rHu BMP-2; PromoKine/ PromoCell, Heidelberg, Germany) 10 ng/ml verwendet.

Um die richtige Konzentration herauszufinden, wurden in Vorversuchen bei dermalen Fibroblasten pro Stimulans 6 Petrischalen mit unterschiedlichen Konzentrationen über 60 min stimuliert:

TGF-beta1:	5 ng/ml	1 ng/ml	0,5 ng/ml	0,1 ng/ml	0,05 ng/ml	0 ng/ml
BMP-2:	20 ng/ml	10 ng/ml	5 ng/ml	1 ng/ml	0,1 ng/ml	0 ng/ml
IFN-gamma	200 ng/ml	100 ng/ml	50 ng/ml	10 ng/ml	1 ng/ml	0 ng/ml

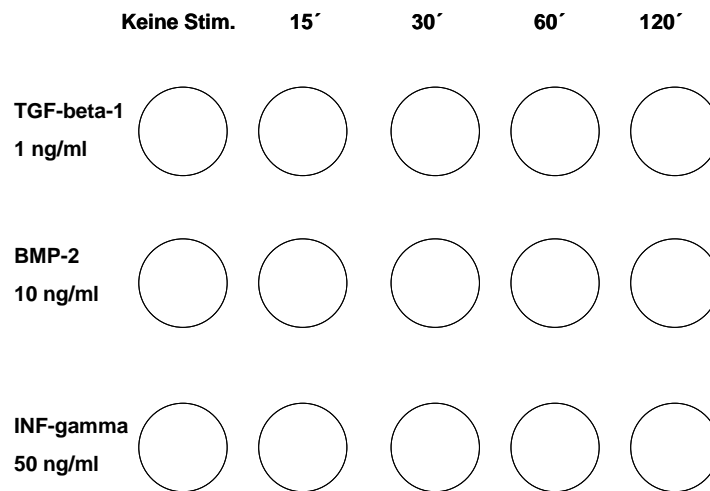
Anschließend wurde Protein extrahiert (s. 3.5.2) und ein Westernblot (s. 3.5.3) laufen gelassen. Pro Stimulans wurden 2 identische Gele angefertigt, die bei der TGF-beta-1-Reihe mit pSmad2 (cell signaling Ser 465/467) und Anti-Smad2/3 (Transduction, S66220), bei der BMP-2-Reihe mit pSmad 1/5/8 (cell signaling, Ser 463/465) und Anti-Smad4 (Transduction S66220), bei der IFN-gamma-Reihe mit pSTAT1 (Biolabs; y701) und Anti-STAT4 (Transduction, S21420) inkubiert wurden.

##### 3.5.1.1 Zeitreihe von TGF-beta-1, BMP-2 und IFN-gamma

Für die Zeitreihen-Stimulation wurden die Zellen in 15 100 mm-Petrischalen gesplittet. Bei einer Konfluenz von ca. 70-90% wurden die Zellen pro Stimulans TGF-beta1 (1 ng/ml), BMP-2 (10 ng/ml) und IFN-gamma (50 ng/ml) 15 min, 30

### 3. Patienten und Methoden

min, 60 min und 120 min stimuliert. Pro Reihe wurde eine nichtstimulierte Kontrolle mitgeführt.



**Abbildung 7 zeigt die Versuchsplanung bei der Zeitreihen-Stimulation. Es wurden die Zellen mit TGF-beta-1, BMP-2 und INF-gamma 0, 15, 30, 60 und 120 min stimuliert.**

Nach der Stimulation wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen und anschließend Protein extrahiert (s. 3.5.2).

Diese Versuchsreihe wurde bei 8 IPP-Zelllinien und 3 Zelllinien des Kontrollkollektivs durchgeführt.

Die Zeitreihen-Experimente wurden durchgeführt, um im Westernblot zu sehen, nach welchem Zeitraum nach Stimulation die Translokation der Transkriptionsfaktoren Smad ausgelöst wird.

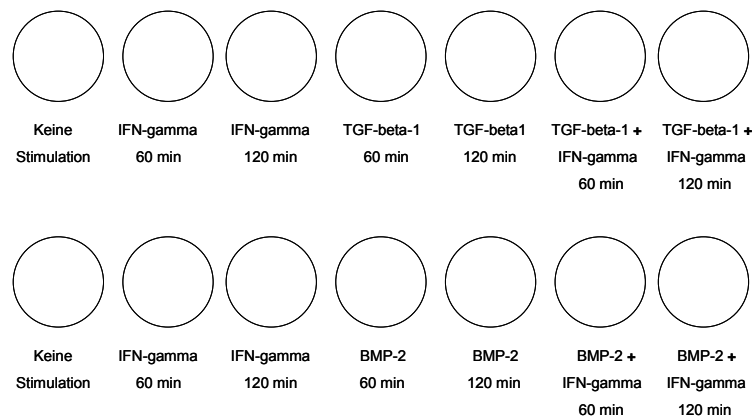
#### **3.5.1.2 Co-Stimulation mit INF-gamma und TGF-beta-1 bzw INF-gamma und BMP-2**

Für diese Experimentreihe wurden die Zellen in 14 100 mm Petrischalen gesplittet, bei einer Konfluenz von 70-90% entsprechend **Abbildung 8** stimuliert und anschließend Protein extrahiert. INF-gamma wirkt antagonistisch zu TGF-beta-1 indem es zu einer vermehrten Expression von inhibitorisch wirkenden Smad6/7 führt und die Komplexbildung von phosphorylierten Smad2/3 mit Smad4 verhindert.



### 3. Patienten und Methoden

Diese Experimentreihe wurde bei 8 IPP-Zelllinien und 3 Zelllinien des Kontrollkollektivs durchgeführt.



**Abbildung 8 zeigt die Versuchsplanung bei der Co-Stimulation. Es werden die Zellen mit TGF-beta-1, BMP-2 und IFN-gamma je 60 und 120 min stimuliert und zusätzlich TGF-beta-1 beziehungsweise BMP-2 gemeinsam mit dem Antagonisten IFN-gamma 60 und 120 min.**

#### 3.5.2 Proteinextraktion

Nach Stimulation der Fibroblasten erfolgte die Proteinextraktion. Es wurde bei den ersten Zelllinien eine Gesamtproteinextraktion durchgeführt, bei den meisten Zelllinien eine getrennte Extraktion nach cytosolischen und nukleären Proteinen. Nach der Extraktion wurde die Proteinkonzentration nach Zugabe von Dye Reagenz (Bio Rad; Protein Assay , Dye Reagenz Concentrate; Cat. 500 000 6, Hercules, CA) im Photometer bei 595 nm gemessen. Als Proteinstandard wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA (bovine serum albumin) mitgeführt.

#### 3.5.2.1 Zelluläre Gesamtproteinextraktion

Auf jede Petrischale wurden 250 µl Zellysepuffer, bestehend aus 20 µM Tris pH7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM beta-Glycerolphosphat, 20 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> pH10 und 1 µg/ml Complete, pipettiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Spatel abgeschabt, bis die Flüssigkeit trüb wurde, d.h. die Fibroblasten enthalten sind. Dieser Extrakt wurde in Eppendorfhütchen pipettiert, 60 min auf Eis inkubiert und alle 5 min gevortext. Anschließend wurden die Eppendorfhütchen 10 min bei 4°C bei 5500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren beziehungsweise direkt für den Westernblot verwandt.

#### 3.5.2.2 Cytosolische und nukleäre Proteinextraktion

Die Proteinextraktion getrennt nach Proteinen aus Cytoplasma und Nukleus erfolgt aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften von Plasma- und Kernmembranen durch Zugabe von Puffern unterschiedlicher Salzkonzentration. Der Low-Salt-Buffer setzt sich aus 20 mM Hepes pH7,9, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,2% Nonidet P-40, 10% Glycerol, 0,1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> und 1 µg/ml Complete (Proteinase Inhibitoren) zusammen. Der High-Salt-Buffer besteht aus 20 mM Hepes pH7,9, 420 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20% Glycerol, 0,1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> und 1 µg/ml Complete.

Nach der Zellstimulation wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen, gründlich abgesaugt, 1 ml PBS auf die Kulturschalen pipettiert und auf Eis gelegt. Die Zellen wurden mit einem Schaber von der Kulturschale gelöst und die trübe Flüssigkeit in ein Eppendorfhütchen pipettiert. Nach 2minütiger Zentrifugation bei 5 000 U/min bei 4°C wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Im Sediment fanden sich cytosolische und nukleäre Proteine. Das dreifache Volumen des Sedimentes wurde an Low-Salt-Buffer zugefügt, 10 min auf Eis inkubiert und zwischenzeitlich 1-2x gevortext. Nach 1minütiger Zentrifugation bei 10 000 U/min bei 4°C wurde der cytosolische Extrakt als Überstand aufbewahrt. Das Sediment wurde in High-Salt-Buffer resuspendiert. Es ist das 2-3fache Volumen des Sedimentes an Puffer notwendig. Nachdem die Proben 30 min auf Eis inkubiert und mehrfach gemischt

### 3. Patienten und Methoden

wurden, wurde nach Zentrifugation bei 13 000 U/min über 7 min bei 4°C der Überstand indem die nukleären Proteine gelöst sind aufgefangen.

#### 3.5.3 Westernblot

Für die Elektrophorese wurden selbstgegossene 10%ige SDS-Polyacrylamidgele mit 15 Geltaschen verwendet. Je 2 Gele wurden in eine Westernblot-Kammer gespannt und mit 1xSDS als Laufpuffer aufgefüllt.

Westernpuffer wurde mit 100 mM Tris-Cl pH6,8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% Bromphenole Blue und 20% Glycerol zubereitet. Die Proben wurden mit der gleichen Menge (1:1) an Westernpuffer versetzt, kurz zentrifugiert und 10 min bei 95°C im Wasserbad gekocht, dann 10 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert und in die erste noch freie Tasche 10 µl Proteinmarker (Precision Plus Protein® Standards, All blue, Cat# 161-0373 Bio-Rad-Labaratories und Broad Range Protein Molecular Weight Markers, Promega,Cat#V8491) pipettiert. Die Elektrophorese lief bei 60 mA bis alle 9 Banden des Proteinmarkers sichtbar waren.

Die Gele wurden umgebettet, eine Membran (Trans-Blot Transfer Medium, Pure Nirtocellulose Membrane, Cat.#162-0112, Bio-Rad Labaratories, Hercules, CA) aufgelegt und zwischen Filterpapier (Bio-Rad Labaratories, Hercules, CA) und Schwämme in eine Lochhalterung luftblasenfrei eingelegt und zusammen mit einer Eisbox in die Kammer auf einen Magnetrührer gestellt. Der Transferpuffer, bestehend aus 200 ml Methanol, 2,42 g Tris und 11,2 g Glycin, aufgefüllt auf 1000 ml Aqua dest., wurde in die Kammer gegossen. Der Transfer erfolgte entweder bei 12 Volt über ca. 10 Stunden oder bei 120 Volt über 60 min.

Die Proteine wurden auf die Membran transferiert. Die Membran wurde kleiner geschnitten und 3x in 1xTBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran in 5% non-fat-milk (Sigma®, Saint Lois, Missouri, USA) 30 min geblockt und danach mit einem Primärantikörper für mindestens 60 min inkubiert. Die verwendeten Antikörper, ihre Verdünnung und der dazugehörige Sekundärantikörper sind **Tabelle 7** zu entnehmen.

### 3. Patienten und Methoden

Primär-Antikörper	Konzentration	Klon	Firma	Sekundär-Antikörper	Experiment	
					Zeitreihe	Co-Stimulation
pSmad2/3	1:500	Ser465/467	Cell Signaling	rabbit	T	T
Smad2/3	1:1000	keine Angabe	BD Transduction	mouse	T	T
Smad1/2/3	1:1000	H-2	Santa Cruz	mouse	T, B, I	T, B
pSmad1/5/8	1:500	Ser463/465	Cell Signaling	rabbit	B	B
Smad1	1:1000	#06-653	Upstate	rabbit	B	B
pSTAT1	1:500	Tyr701	Cell Signaling	rabbit	I	T, B
STAT1	1:1000	S21120	Transduction	mouse	I	T, B
C23	1:1000	MS-3 sc-8031	Santa Cruz	mouse	T, B, I	T, B

**Tabelle 7 stellt alle beim Westernblot verwendeten Primärantikörper unter Angabe des Klons, der Firma, der Konzentration und des dazu gehörenden Sekundärantikörpers dar. Es wird gezeigt, welche Antikörper bei welchen Experimentreihen angewendet wurden. T steht für TGF-beta-1, B für BMP-2 und I für IFN-gamma.**

Nach Entfernung des Primärantikörpers wurde die Membran 3x mit 1xTBST gewaschen, danach 60 min mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde Luminal Mix (Mischung aus Super Signal™ West Pico Stable Peroxide Solution (Prod# 1856135, Pierce Perbio®, Rockford/USA) und Super Signal™ West Pico Luminal/Enhancer Solution (Prod# 1856136, Pierce Perbio®, Rockford/USA) in gleichen Teilen) auf der Membran verteilt und 5 min bei RT inkubiert. Die Membran wurde vorsichtig am Rand abgetupft und luftblasenfrei in Frischhaltefolie gewickelt. Die Membran wurde in eine Kodak-Cassette mit einem Film (X-Omat AR-Film, Kodak) gelegt und anschließend im Kodak X-OMAT 2000 Processor entwickelt.

Um die Membran erneut benutzen und mit weiteren Antikörpern inkubieren zu können, müssen die alten Antikörper entfernt, d.h. gestrippt werden. Dies erfolgte pro Probe mit 10 ml bei 50°C vorgewärmten Stripping-Buffer (9,27 ml MiliQ water, 1ml 20% SDS und 0,625 ml 1M Tris pH6,8) frisch versetzt mit 35 µl beta-Mercaptoethanol. Das Reagenz wurde über der Membran verteilt und bei 50°C eine Minute inkubiert. Nach 3x Waschen mit 1x TBST konnte die Membran erneut verwendet werden.

### 3. Patienten und Methoden

Im Rahmen der Vorversuche wurde sowohl die beste Konzentration an beta-Mercaptoethanol (35 µl und 70 µl / 10 ml Striping Buffer), als auch die günstigste Inkubationszeit (1, 3 und 5 min) ermittelt.

#### **3.6 Bildbearbeitung**

Die am Leica ASMDW Mikroskop photographierten Immunofluoreszenz-Bilder wurden mit der mitgelieferten Software Leica ASMDW bearbeitet.

Die Westernblot- und PCR-Gel-Banden wurden zur besseren optischen Darstellung mit Adobe Photoshop 4.0 überarbeitet.

Beim Photographieren der PCR-Banden wurde das mitgelieferte Software-Programm KODAK 1D 3.5 zur Überarbeitung genutzt.

## 4. Ergebnisse

### 4. Ergebnisse

#### 4.1 Basisdaten IPP

In der Studie waren 16 Patienten eingeschlossen, bei denen eine operative Penisschaftbegradigung durchgeführt wurde. Bei 9/16 wurden Plikaturnähte nach Essed-Schroeder durchgeführt, bei 7/16 eine Small-Incision mit Graft-Interponat. Die Patienten waren im Durchschnitt 54,3 Jahre alt. Die IPP bestand zum Zeitpunkt der Operation durchschnittlich 25,2 Monate. Bei 69% der Patienten bestand nur ein peniler Plaque. Dieser war bei knapp der Hälfte (44%) kalzifiziert. Die Hauptpenisdeviation variierte von 45-90°. Bei 13/16 der Patienten bestand eine nach dorsal gerichtete Penisdeviation. Eine IPP-bedingte begleitende erektile Dysfunktion lag bei 5/16 des Patientengutes vor. (s. **Tabelle 8**)

Patienten	n=16		
Altersdurchschnitt (min./max.) [Jahre]	54,3	(42–63)	
Erkrankungsdauer (min./max.) [Monate]	25,2	(14-60)	
<b>Anzahl von Plaques / Patient</b>			
1	11/16	(≈69%)	
2	5/16	(≈31%)	
<b>Kalzifizierung</b>	7/16	(≈44%)	
<b>Deviation</b>			
Hauptdeviation	68°	(45-90°)	
dorsal	69°	(45-90°)	13/16 (≈81%)
ventral	50°		1/16 (≈ 6%)
links	65°	(50-80°)	2/16 (≈13%)
<b>max. spontaner Erektionsgrad</b>			
E4	3/16	(≈19%)	
E4-5	2/16	(≈13%)	
E5	11/16	(≈69%)	
<b>Operation</b>			
Plikaturnähte nach Essed-Schroeder	9/16	(≈57%)	
Small Incision und Graft-Interponat	7/16	(≈44%)	

**Tabelle 8 zeigt die Basisdaten der IPP-Patienten, bei denen eine Zellkultur aus dem Plaque angelegt wurde.**

## 4. Ergebnisse

### 4.2 Basisdaten Kontrollkollektiv

Als Kontrollen wurden Patienten eingeschlossen, an denen eine penile Operation durchgeführt wurde. Bei 5 Patienten wurde eine hydraulische Penisprothese implantiert, bei 2 Patienten aufgrund einer genuinen Penisdeviation eine operative Penisschaftbegradigung in der Technik nach Essed-Schroeder durchgeführt. Bei diesen Patienten bestand weder anamnestisch noch klinisch eine IPP. Der Altersdurchschnitt lag bei 43,3 Jahre. Es wurde eine Zellkultur aus Gewebe der penilen Tunica albuginea als Kontrolle angelegt. (s. **Tabelle 9**).

Kontrollkollektiv	n=7
Altersdurchschnitt (min./max.) [Jahre]	43,3 (18–66)
Operation	
Plikaturnähte nach Essed-Schroeder	2/7 (≈29%)
Penisprothese	5/7 (≈71%)

**In Tabelle 9 sind die Basisdaten des Kontrollkollektives dargestellt, von denen eine Zellkultur aus Gewebe der penilen Tunica albuginea angelegt wurde.**

### 4.3 Ergebnisse der RT-PCR

Die Fibroblasten-RNA wurde untersucht auf das Vorhandensein und die Stärke der Expression von Smads.

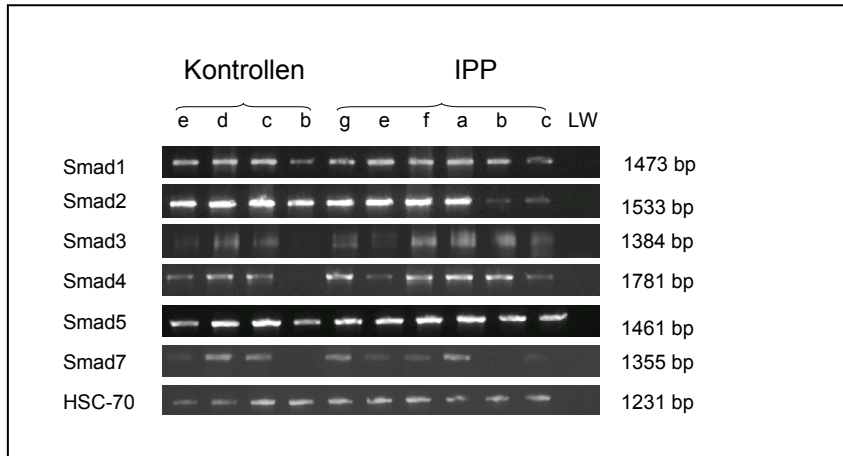
Es wurde RNA von 4 Kontrollen mit RNA von 6 IPP-Fibroblasten verglichen. Als Positivkontrolle wurde das house-keeping-Gen HSC-70, ein in allen Geweben vorkommendes heat-shock-Protein, mitgeführt.

Smad1 und Smad5 wurden bei allen Proben exprimiert. Bei der Kontrolle Kb und bei IPPc zeigte sich eine diskret schwächere Expression von Smad1.

Smad2 wurde von allen Kontrollen gleich stark exprimiert. Bei 2 von 4 IPP-Patienten (IPPb und IPPc) zeigte sich eine schwache Smad2-Expression. Smad3 wurde unterschiedlich stark bei den 10 Proben exprimiert, am stärksten bei IPP-Patienten. Co-Smad4 konnte bei der Kontrolle Kb nicht nachgewiesen werden. Bei den beiden IPPe und IPPc zeigte sich eine stark reduzierte

## 4. Ergebnisse

Expression von Smad4. Insgesamt jedoch war die Expression von Co-Smad4 bei der IPP-Gruppe stärker ausgeprägt als bei den Kontrollen. Der inhibitorisch wirkende Smad7 zeigte große Expressionsdifferenzen innerhalb des Kontroll- und des Patientenkollektivs. Bei je einer Probe aus beiden Gruppen (Kb und IPPb) konnte Smad7 nicht nachgewiesen werden.



In Abbildung 9 ist die Expression von Smad1, 2, 3, 4, 5, 7 bei RNA der Kontrolle und IPP dargestellt. Als Positivkontrolle wurde HSC-70 verwendet. Die Patienten sind codiert, LW steht für Leerwert (Negativkontrolle).

### 4.4 Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Mikroskopie

#### 4.4.1 Fibroblastennachweis

Aus dem Gewebe der Tunica albuginea des Penis wurden Fibroblasten-Zellkulturen angelegt. Die Zellen wuchsen als Monolayer. Die typische Fibroblasten-Morphologie wurde bei jedem Kulturmediumwechsel mikroskopisch überprüft. Die Zellen waren spindelförmig mit typischen Zellausläufern.

Immunocytochemisch wurden Muskelzellen und Myofibroblasten durch Anfärben mit alpha-smooth-muscle-Actin (alpha-SMA) ausgeschlossen. Es ist bekannt, daß Fibroblastenzellkulturen nach mehreren Passagen zu glatten Muskelzellen mutieren können. In Vorversuchen wurden Epithelzellen durch Anfärben der Zellen mit Pancytokeratin ausgeschlossen.



## 4. Ergebnisse

### 4.4.2 Immunocytologische Zeitreihen-Stimulation

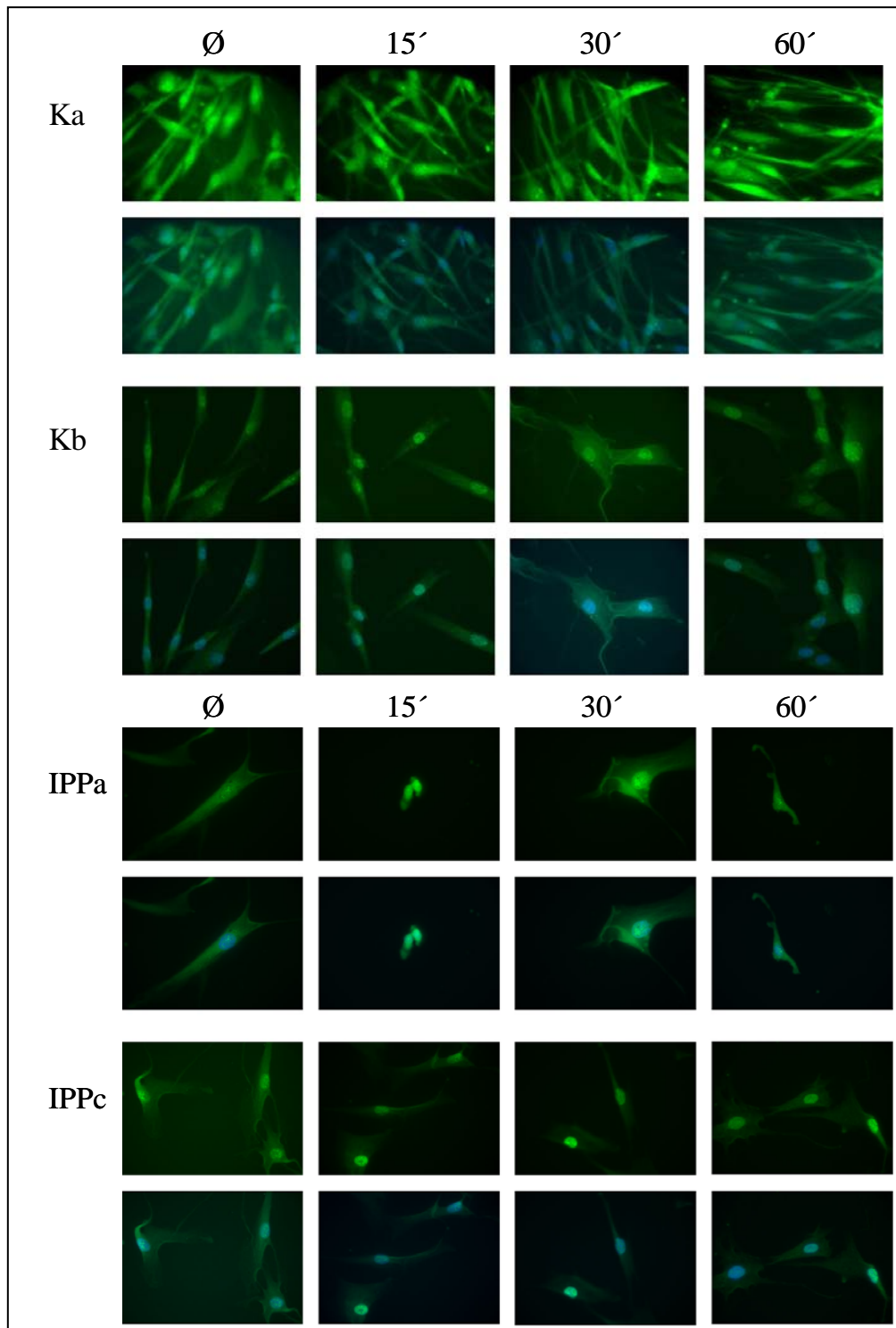
Bei jeder Zelllinie wurden Fibroblasten auf Objektträger gesplittet. Die Fibroblasten wurden jeweils 0, 15, 30 und 60 min mit TGF-beta-1 beziehungsweise BMP-2 stimuliert und anschließend mit Smad-Antikörper inkubiert.

#### 4.4.2.1 Stimulation mit TGF-beta-1

Smads befinden sich als Transmitter im Cytoplasma der Zelle. Nach Stimulation mit TGF-beta-1 werden Smad2 und Smad3 phosphoryliert. Nach Bindung mit Co-Smad4 wandern sie in den Nukleus.

Bei den IPP-Fibroblasten wurde die Translokation von Smad1/2/3 in den Nukleus nach 15 min nachgewiesen. Noch nach 60 min befanden sich die Botenstoffe im Zellkern zur Induktion der Transkription von mRNA. In der Kontrollgruppe waren die Smads auch nach 15 min in den Nukleus transloziert. Sie wurden schneller wieder abgebaut und waren nach 30 min sowohl nukleär als auch cytoplasmatisch nachweisbar. Das Ausmaß der Translokation war schwächer als bei den IPP-Fibroblasten.

#### 4. Ergebnisse



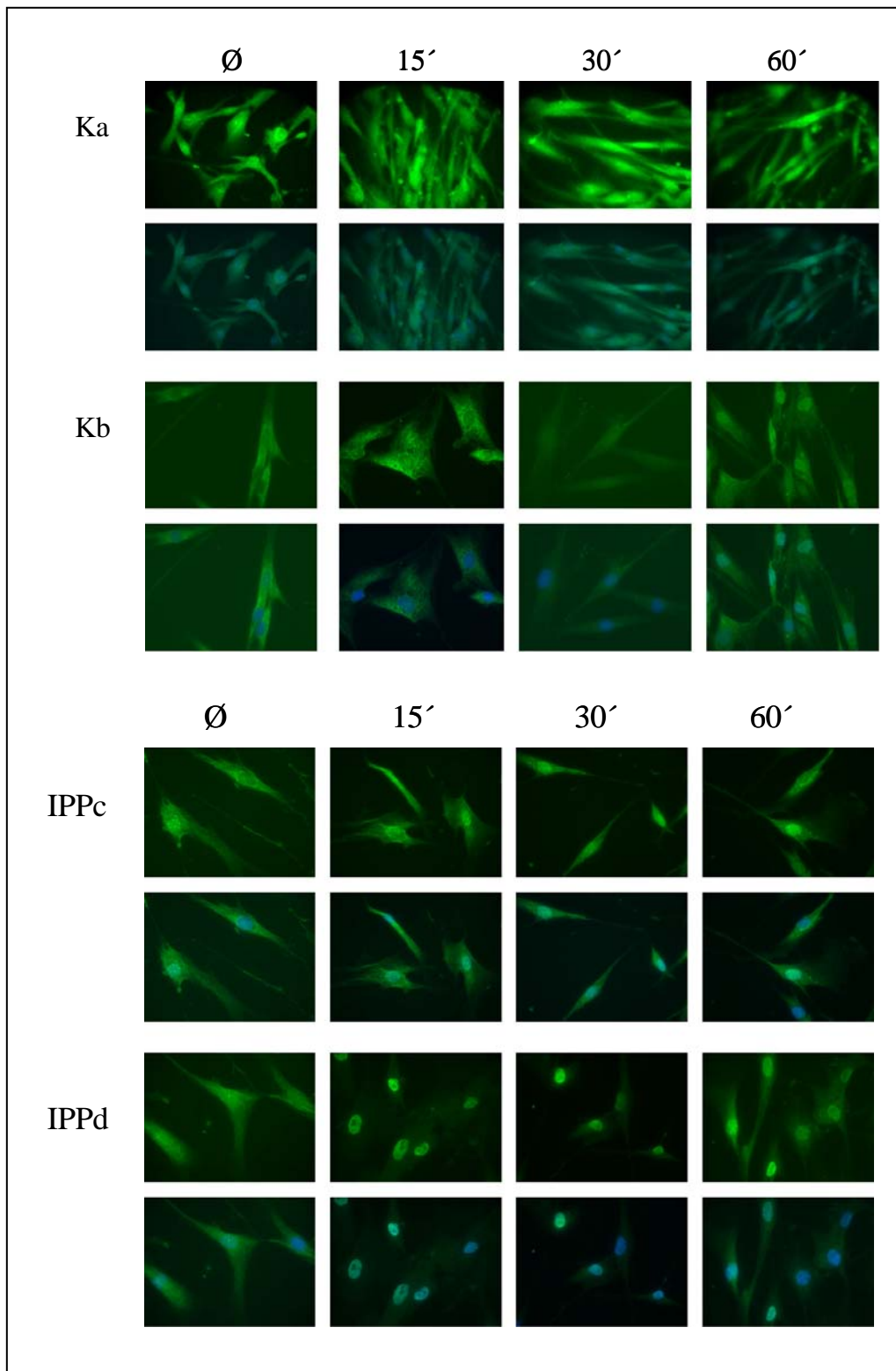
In Abbildung 10 ist die Wanderung von Smad1/2/3 vom Cytoplasma in den Nukleus nach TGF-beta-1 Stimulation dargestellt. Oben werden repräsentative Beispiele vom Kontrollkollektiv, unten von IPP-Fibroblasten gezeigt.

Die TGF-beta-1-stimulierten Zellen wurden mit Smad3 inkubiert. Bei dem selektiven Antikörper war die Translokation in IPP-Fibroblasten zum Teil nach 15

#### 4. Ergebnisse

min komplett in den Nukleus vollzogen, zum Teil begann die Translokation und vollendete sich erst nach 30 min. Die Translokation von Smad3 war nicht bei allen Zelllinien gleich ausgeprägt. Beim Kontrollkollektiv fand keine komplette Smad-Translokation in den Nukleus statt. Die Translokation von Smad3 findet bei IPP-Fibroblasten schneller und ausgeprägter statt als bei der Kontrollgruppe.

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 11 zeigt die Translokation von Smad3 nach TGF-beta-Stimulation bei IPP und Kontrollgruppe.**

Co-Smad4 bildet mit den phosphorylierten Smads einen Komplex. Nur die Verbindung ist in der Lage in den Nukleus zu translozieren. Bei IPP-Fibroblasten

#### 4. Ergebnisse

zeigte sich nach 30 min eine Translokation von Smad4 in den Zellkern. Bei der Kontrollgruppe fand diese bereits nach 15 min statt.

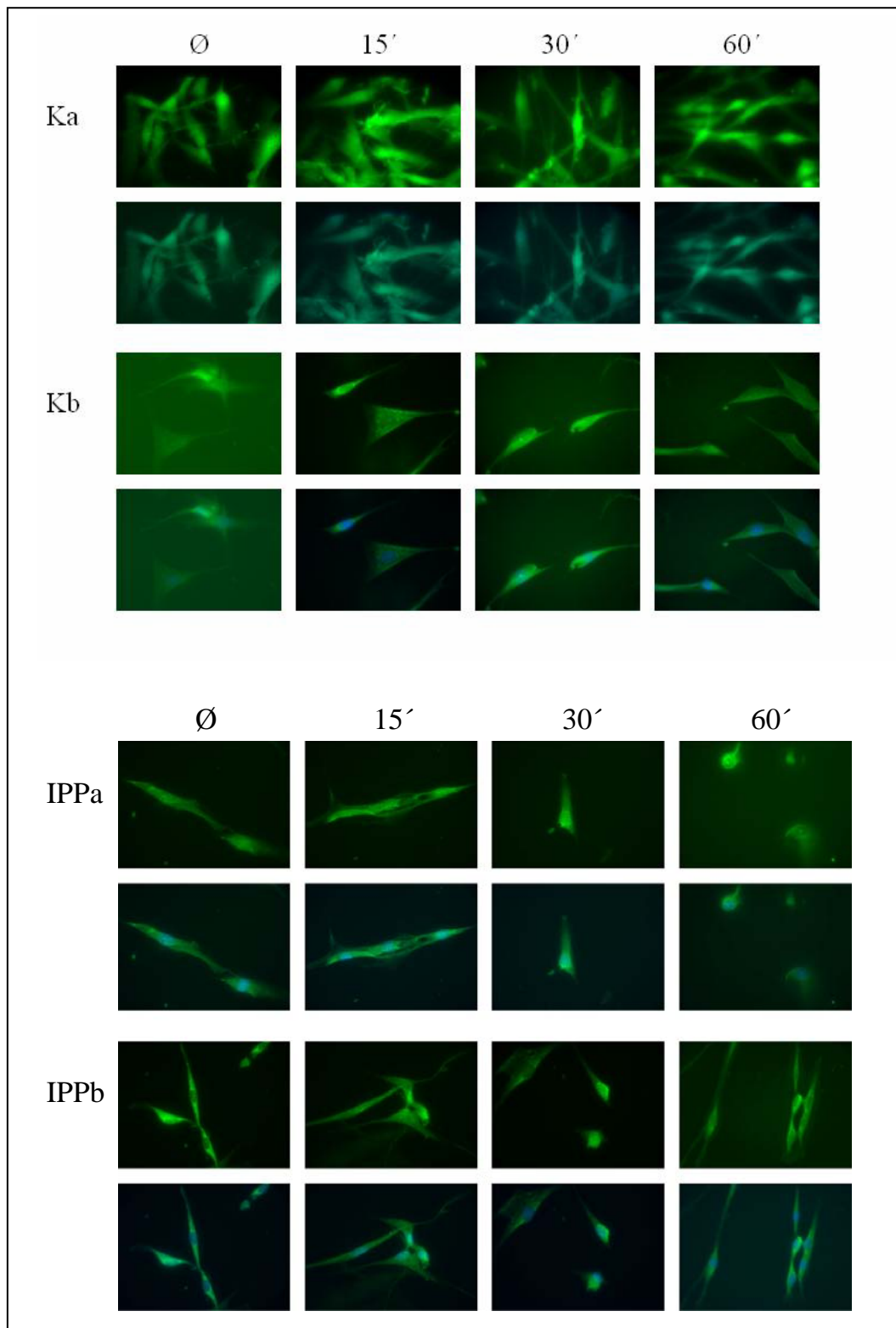


Abbildung 12 stellt mit Smad4 inkubierte Fibroblasten dar. Die Zellen wurden mit TGF-beta-1 stimuliert.

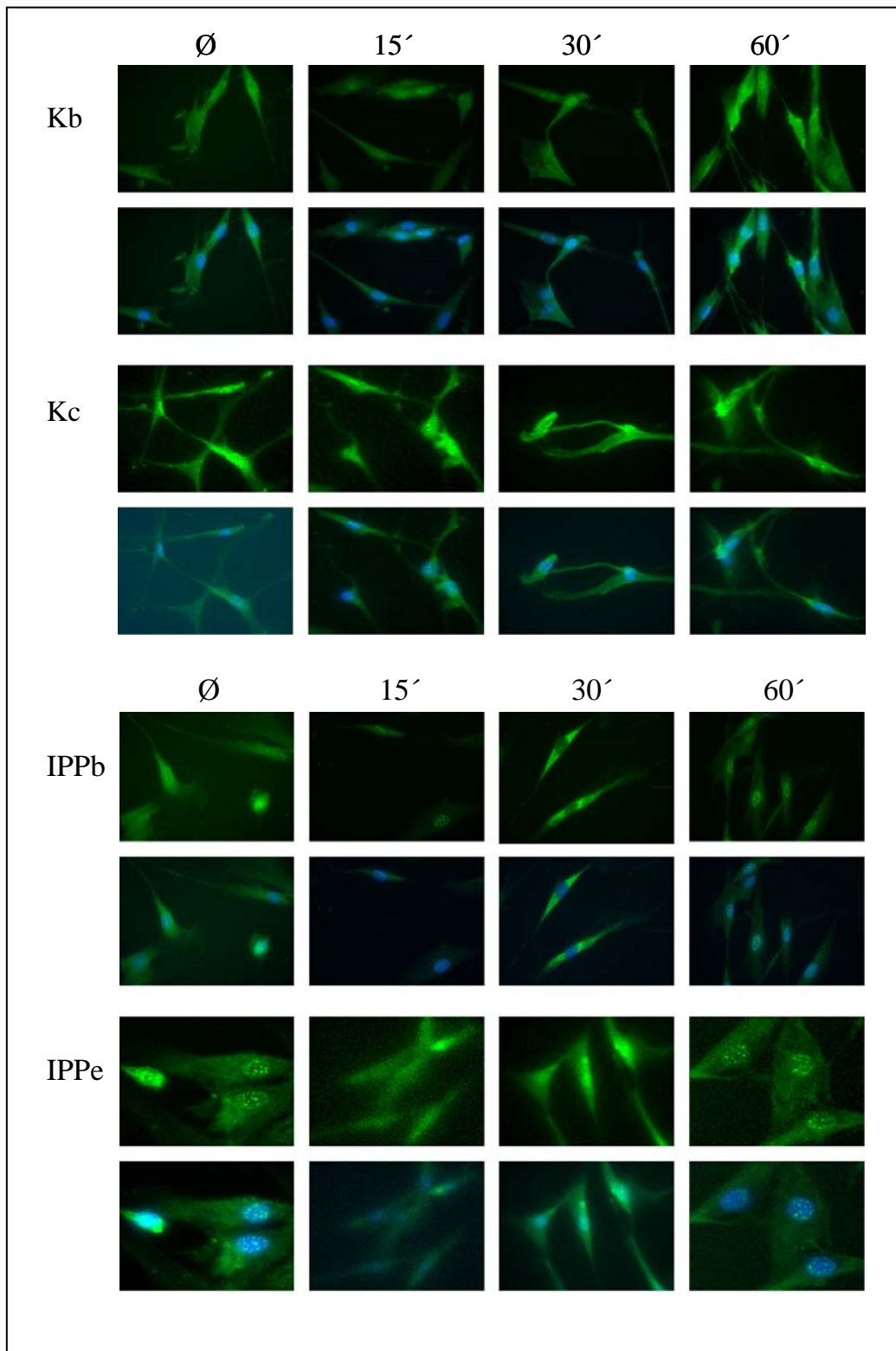
## 4. Ergebnisse

### 4.4.2.2 Stimulation mit BMP-2

Die aus dem IPP-Plaques sowie gesunder Tunica albuginea gezüchteten Fibroblasten wurden auf Objektträger gesplittet. Die Zellen wurden mit BMP-2 über einen Zeitraum von 0, 15, 30 und 60 min stimuliert. Anschließend wurden die Zellen jeweils mit Smad1/2/3, Smad1 und Smad4 inkubiert.

Bei den Zellen, die mit dem Antikörper-Mix Smad1/2/3 inkubiert wurden, wird nach Stimulation mit BMP-2 nur Smad1 nach Bindung von BMP-2 an seinen Rezeptor phosphoryliert. Daher sind in allen Zeitstufen Smads cytosolisch nachweisbar. Nach 15 min war bei IPP-Fibroblasten eine unvollständige Translokation in den Nukleus nachweisbar. Nach 60 min waren bei einigen Zelllinien die Smads bereits wieder zurücktransportiert ins Cytosol. Im Kontrollkollektiv translozierten die Smads in 15 min. Nach 60 min war bereits ein Großteil wieder zurück ins Cytosol transportiert worden.

#### 4. Ergebnisse

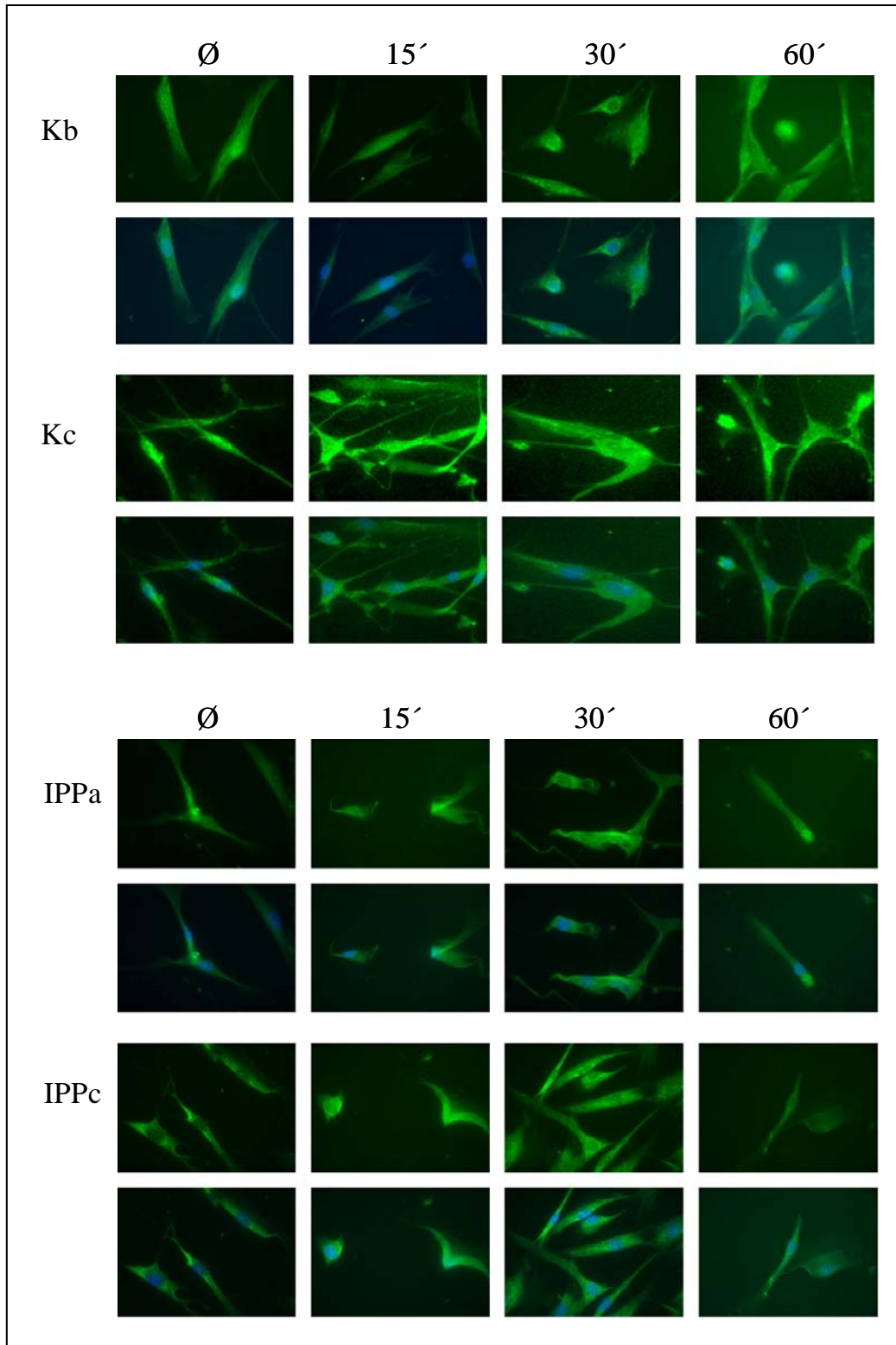


**In Abbildung 13 ist die Translokation von Smad1/2/3 unter BMP-2-Stimulation dargestellt.**

Nach 15minütiger Stimulation der IPP-Zellen mit BMP-2 wurden Smad1 Proteine nukleär und cytosolisch nachgewiesen. Nach 30 min sind diese wieder

#### 4. Ergebnisse

überwiegend im Cytoplasma. Beim Kontrollkollektiv zeigt sich Smad1 als perinukleäre und nukleäre Anreicherung.

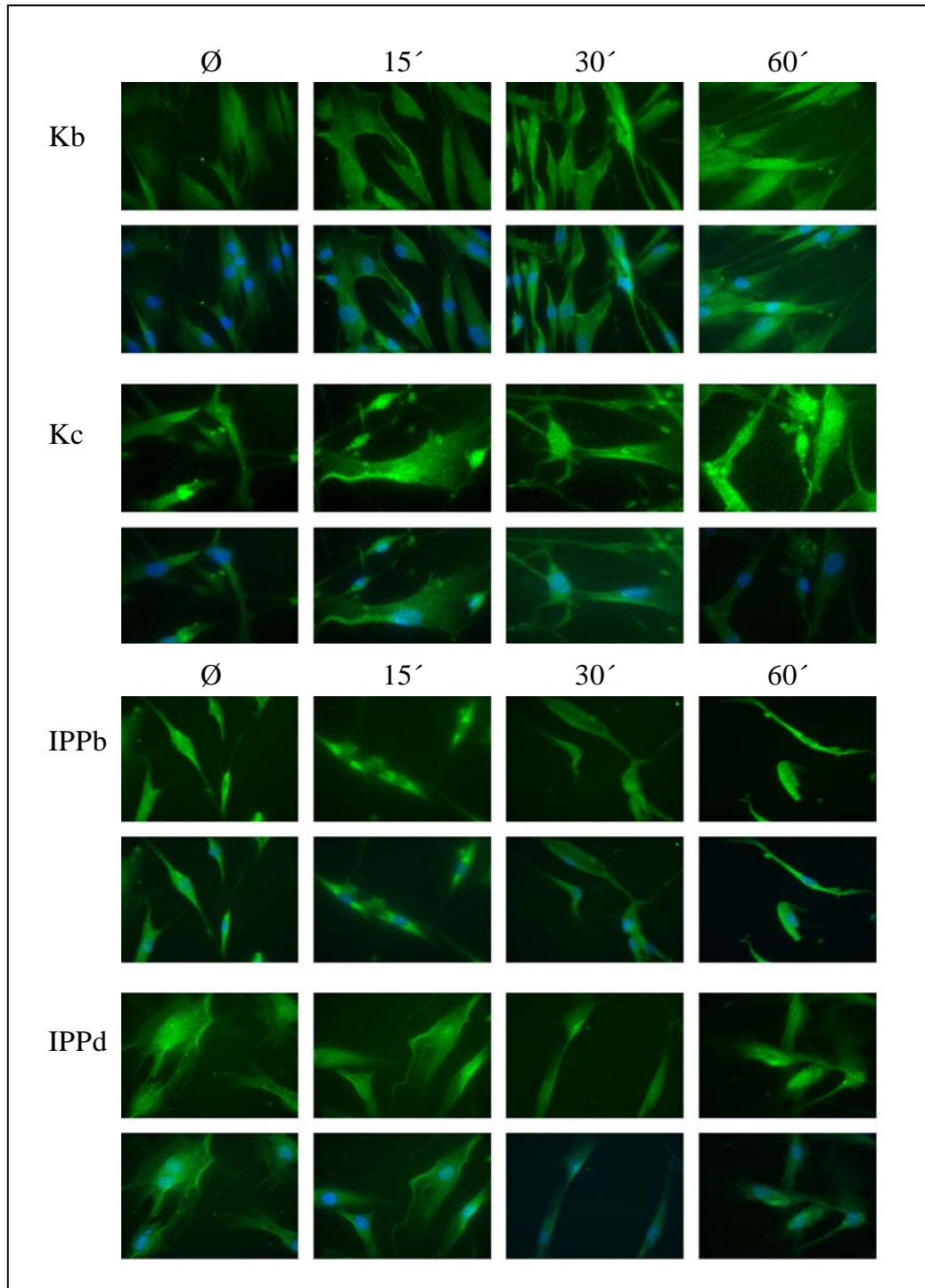


**Abbildung 14 stellt mit Smad1 inkubierte Fibroblasten von IPP und Kontrollkollektiv nach Stimulation mit BMP-2 dar.**



#### 4. Ergebnisse

Verzögert zeigte sich bei den Experimenten die Translokation von Smad4. Nach 30minütiger Stimulation mit BMP-2 reicherte sich der Cofaktor perinukleär und im Nukleus an. Bereits nach 60 min begann der Rücktransport von Smad4 ins Cytosol. Es gab keine Unterschiede zwischen IPP und Kontrollen.



**Abbildung 15 zeigt die Smad4 Translokation vom Cytoplasma in den Nukleus nach Zellstimulation mit BMP-2.**

## 4. Ergebnisse

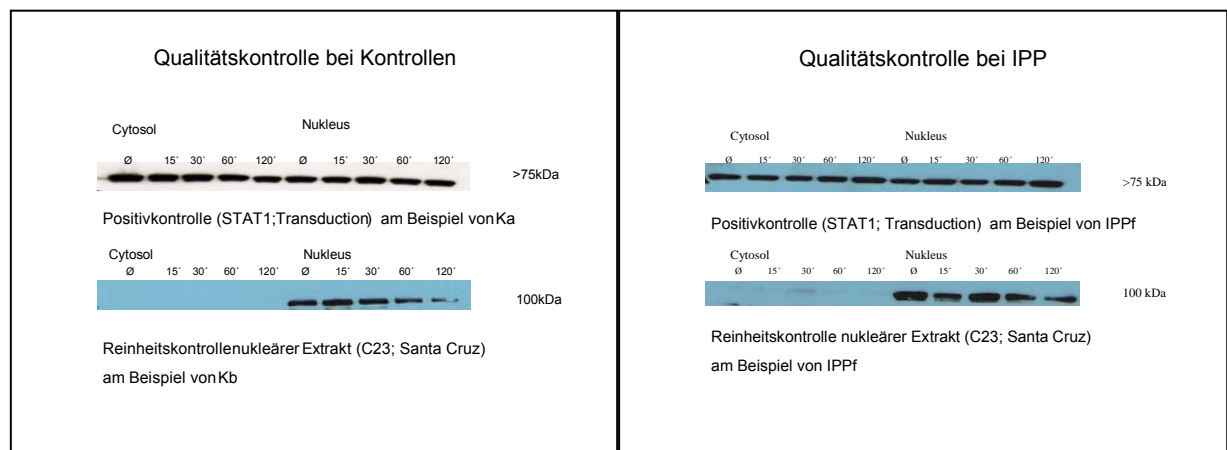
### 4.5 Westernblot-Ergebnisse

Auf Protein-Ebene wurde untersucht, ob Smads vorhanden sind und ob sie den Einflüssen der Stimulation durch TGF-beta-1, BMP-2 und IFN-gamma unterliegen. Es interessierte uns, wie schnell von der Stimulation an die Translokation in den Zellkern und somit die Transkription in mRNA mit Folge der Proteinbildung erfolgt.

#### 4.5.1 Qualitätskontrolle cytosolisch/nukleäres Extrakt

Bei jeder Proteinextraktion wurde im Westernblot die Reinheit der cytosolisch/nukleären Extrakte durch Immunoblotting mit dem Nukleusmarker C23 überprüft. Es färben sich nur die nukleären Extrakte an.

Zum Nachweis, daß alle Extrakte vergleichbare Mengen an Protein enthalten wurde eine Positivkontrolle mitgeführt. Die Westernblot-Membranen von TGF-beta-1-, BMP-2- und IFN-gamma stimulierten Fibroblasten wurden mit Smad1/2/3 inkubiert. In **Abbildung 16** sind exemplarisch Westernblots dargestellt, die repräsentativ für alle Zelllinien sind.



**Abbildung 16 zeigt repräsentativ für alle Zelllinien die Qualitätskontrolle für die Reinheit der Extrakte und die Positivkontrolle.**

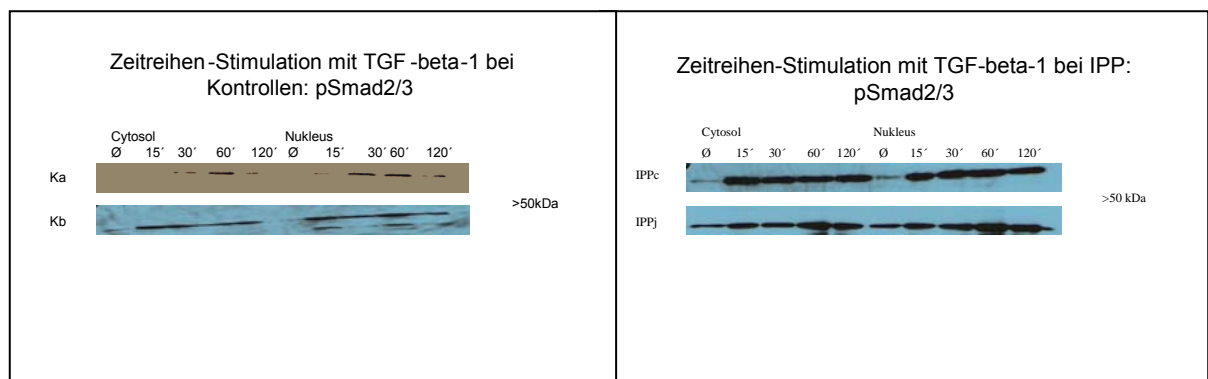
## 4. Ergebnisse

### 4.5.2. Zeitreihen-Stimulation

Die Fibroblasten wurden mit dem Stimulans 15, 30, 60 und 120 min stimuliert. Eine nichtstimulierte Kontrolle wurde mitgeführt. Bei diesem Experiment sollte gezeigt werden innerhalb welcher Zeit die Smads aktiviert werden und in den Nukleus wandern.

#### 4.5.2.1. Stimulation mit TGF-beta-1

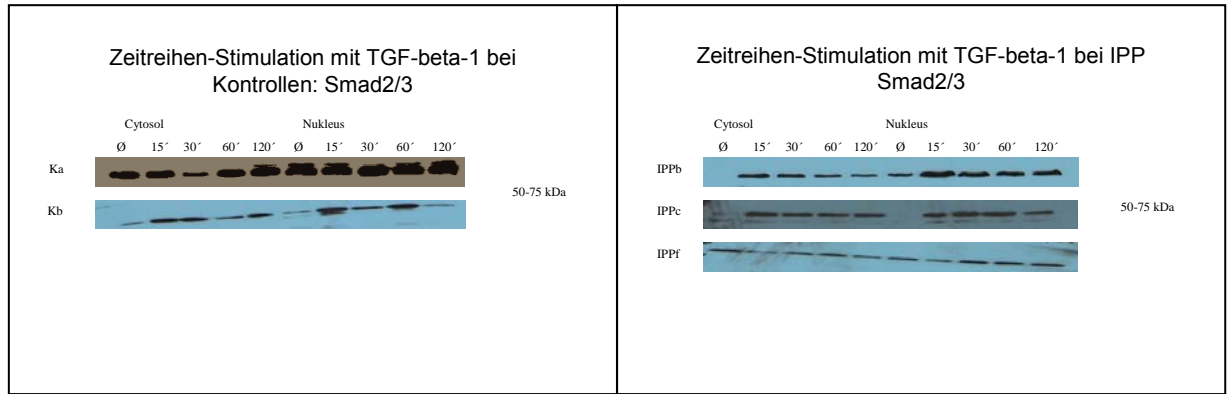
Bei Stimulation der IPP-Fibroblasten mit TGF-beta-1 war nach 15 min eine Phosphorylierung von Smad2/3 nachweisbar. Diese waren teilweise bereits nach 15 min in den Zellkern transloziert. Nach 60 min war das Maximum der Translokation erreicht, danach fand ein Rücktransport von pSmad2/3 ins Cytosol statt, pSmad2/3 wurde abgebaut und ins Cytosol rücktransportiert. Beim Kontrollkollektiv war das Maximum der Translokation früher erreicht, nach 30 min.



**Abbildung 17 zeigt pSmad2/3 nach Zeitreihen-Stimulation mit TGF-beta-1 bei IPP und Kontrollkollektiv an repräsentativen Beispielen.**

Smad2/3 wurde bei den meisten IPP-Zelllinien innerhalb 15 bis 30 min aktiviert und in den Nukleus transloziert. Nach 60minütiger Stimulation begann in einigen Zelllinien bereits der Abbau von Smad2/3. Beim Kontrollkollektiv fand der Abbau teilweise schon früher statt, bereits nach 30 min waren schwache Banden im Westernblot sichtbar.

## 4. Ergebnisse

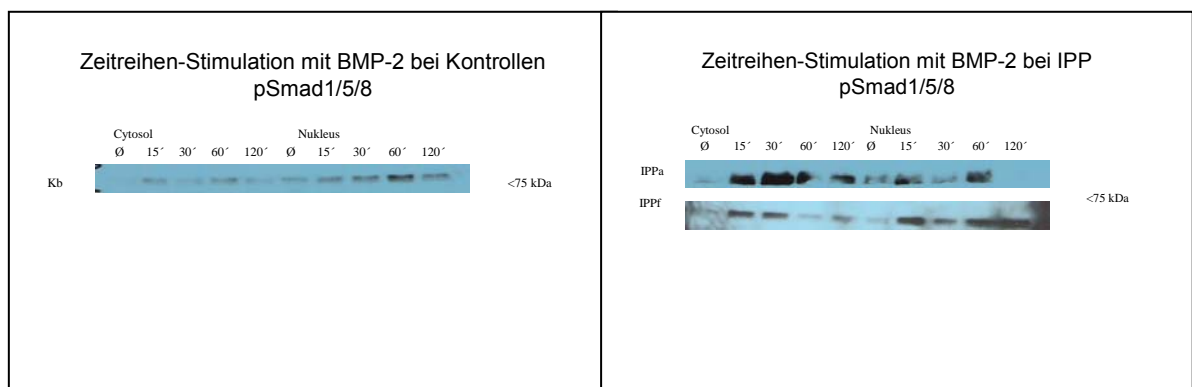


**Abbildung 18 zeigt Smad2/3 nach Stimulation der Fibroblasten mit TGF-beta-1 bei IPP und Kontrollen an repräsentativen Beispielen.**

### 4.5.2.2 Stimulation mit BMP-2

Die Zellreihen wurden mit BMP-2 über 15, 30, 60 und 120 min stimuliert. Eine nichtstimulierte Kontrolle wurde mitgeführt.

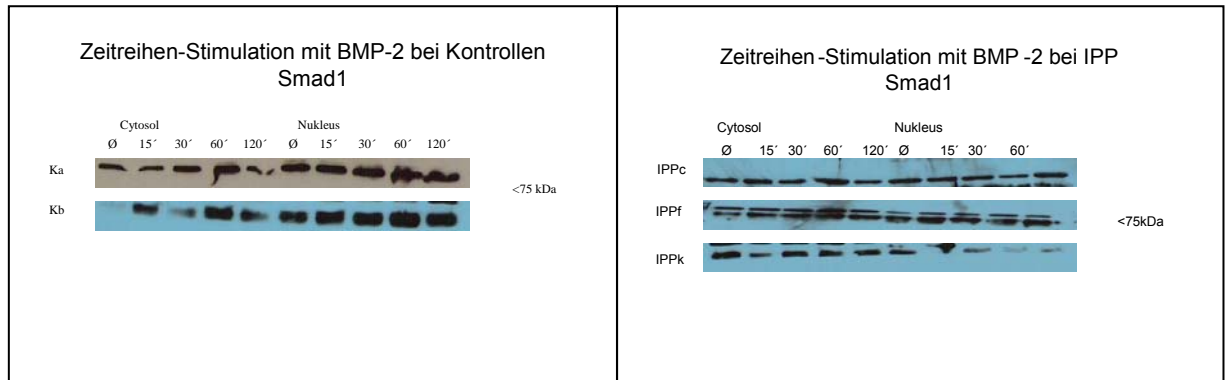
Nach Stimulation mit BMP-2 kommt es zur Phosphorylierung von Smad1/5/8 und somit zur Aktivierung. Innerhalb der IPP-Zelllinien fanden sich Unterschiede. Insgesamt war nach 30 min im Cytosol die größte pSmad1/5/8-Menge nachweisbar. Das Maximum der pSmad1/5/8 Konzentration im Nukleus kann keine Aussage getroffen werden. Bei der Kontrolle scheint nach 15 min im Cytosol und nach 60 min im Nukleus das Maximum der pSmad1/5/8 Konzentration erreicht zu sein.



**Abbildung 19 zeigt Westernblots inkubiert mit pSmad1/5/8 nach Fibroblastenstimulation mit BMP-2 an repräsentativen Beispielen.**

## 4. Ergebnisse

Die Konzentration von Smad1 war im Cytosol und Nukleus über die gesamte Zeitreihe annähernd identisch. Es gab keine Differenzen zwischen IPP und Kontrollen.



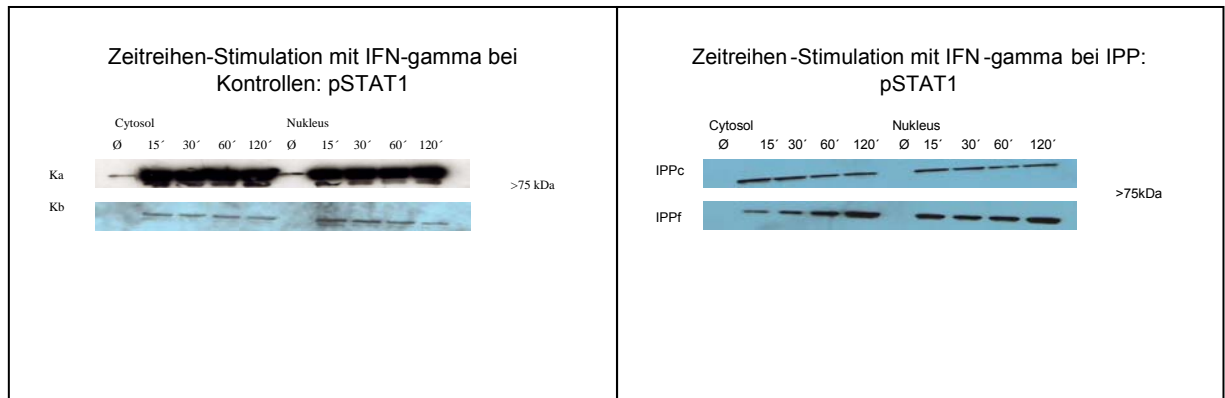
**Abbildung 20 zeigt den Nachweis von Smad1 nach Stimulation mit BMP-2 über 0, 15, 30, 60 und 120 min an repräsentativen Beispielen.**

### 4.5.2.3. Stimulation mit IFN-gamma

Die Fibroblasten von IPP und dem Kontrollkollektiv wurden mit IFN-gamma über 0, 15, 30, 60 und 120 min stimuliert. Ziel war es herauszufinden, innerhalb welcher Zeitspanne es vom Beginn der Stimulation zur Expression und Aktivierung von Transmitter kommt und wie schnell diese in den Nukleus wandern.

Nach 15minütiger Stimulation waren pSTAT1 im Cytosol und im Nukleus nachweisbar. Während der Stimulation erfolgte kein wesentlicher Abbau von pSTAT1, so daß pSTAT1 in beiden Extrakten bis 120 min nachweisbar war. Dies wurde sowohl bei IPP als auch bei den Kontrollen gezeigt.

## 4. Ergebnisse

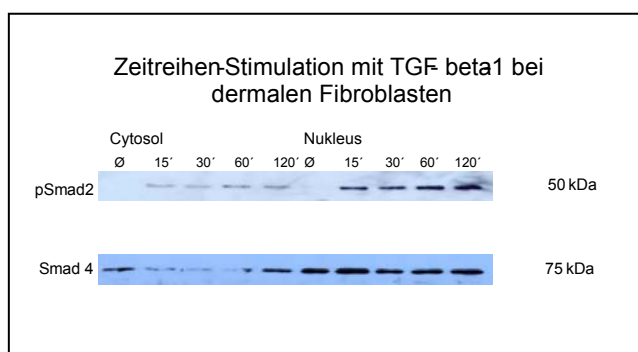


**Abbildung 21 zeigt pSTAT1 an Beispielen von IPP und Kontrollen nach Stimulation mit IFN-gamma über 0, 15, 30, 60 und 120 min.**

### 4.5.2.4. Vergleich mit dermalen Fibroblasten

Die Zeitreihen-Stimulation mit TGF-beta-1, BMP-2 und IFN-gamma wurde wiederholt mit Proteinextrakten aus dermalen Fibroblasten der Vorhaut. Die Ergebnisse wurden mit denen aus Plaque und Tunica albuginea verglichen.

pSmad2 wurde vermehrt im nukleären Proteinextrakt aus stimulierten dermalen Fibroblasten nachgewiesen. Smad4 war cytosolisch beim nichtstimulierten Extrakt vorhanden. Nach 15 bis 60 minütiger Stimulation mit TGF-beta-1 wanderte Smad4 überwiegend in den Zellkern. Nach 120 min wurde Smad4 teilweise wieder rücktransportiert und war vermehrt im Cytosol nachweisbar.



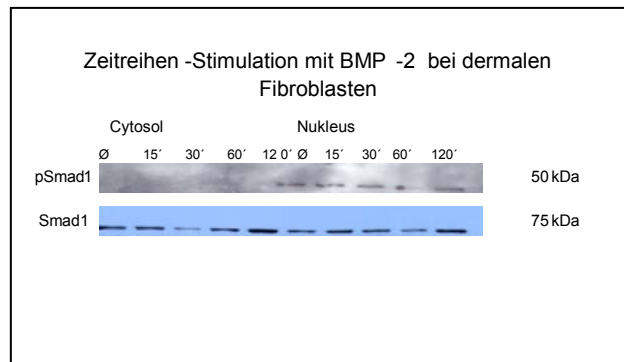
**In Abbildung 22 sind die Westernblots dermalen Fibroblasten nach Stimulation mit TGF-beta-1 über 0, 15, 30, 60 und 120 min dargestellt.**

Bei Fibroblasten der Tunica albuginea war pSmad2 im Cytosol und im Nukleus in vergleichsweise ähnlicher Stärke nachweisbar. Bei dermalen Fibroblasten trat

#### 4. Ergebnisse

pSmad2 vermehrt im nukleären Extrakt auf. Tunicale und dermale Fibroblasten unterscheiden sich bezüglich der Signaltransduktion.

Bei BMP-2 stimulierten dermalen Fibroblasten wurde pSmad1 nur im nukleären Extrakt nachgewiesen. Smad1 hatte sein Maximum sowohl nach 15 als auch nach 120 min Stimulation. Dies galt für beide Extrakte, cytosolisch und nukleär.

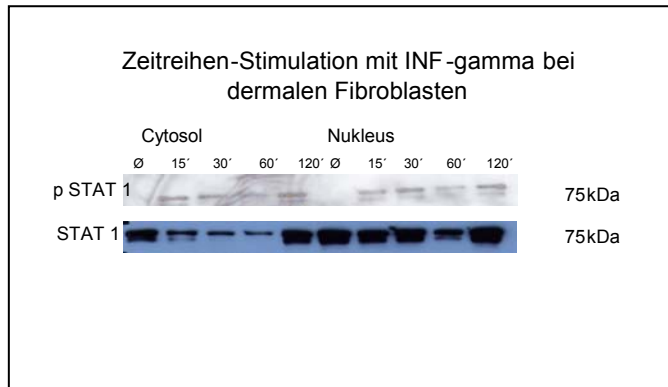


**Abbildung 23 zeigt die Westernblots dermalen Fibroblasten nach Stimulation mit BMP-2 über 0, 15, 30, 60 und 120 min.**

Das Westernblot-Muster unterschied sich von dermalen Fibroblasten und Fibroblasten der Tunica albuginea. Bei tunicalen Fibroblasten waren pSmads cytosolisch und nukleär vorhanden, bei dermalen Fibroblasten waren sie überwiegend im nukleären Extrakt nachweisbar. Smad1 zeigte ein ähnliches Stimulationsmuster. Bei dermalen Fibroblasten trat ein zusätzliches Maximum nach 120 min auf.

## 4. Ergebnisse

Die Westernblots mit IFN-gamma stimulierten dermalen Fibroblastenextrakten zeigten bei pSTAT1 ihr Maximum nach 15 und 120 minütiger Stimulation in beiden Extrakten. STAT1 war überwiegend im Nukleus nachweisbar.



**Abbildung 24 zeigt die mit pSTAT1 und STAT1 inkubierten Westernblots. Es wurden mit IFN-gamma stimulierte cytosolische und nukleäre Extrakte dermalen Fibroblasten verwandt.**

Die Stimulationsmuster von pSTAT1 waren bei tunicalen und dermalen Fibroblasten ähnlich. STAT1 war bei den dermalen Fibroblasten vermehrt nukleär nachweisbar, bei den penilen Fibroblasten cytosolisch und nukleär gleich verteilt. Dermale und tunicale Fibroblasten reagieren unterschiedlich auf die Stimulation mit TGF-beta-1, BMP-2 und IFN-gamma.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheinen sich dermale Fibroblasten nicht als Kontrollkollektiv für die Untersuchung der IPP zu eignen.

### 4.5.3 Co-Stimulation

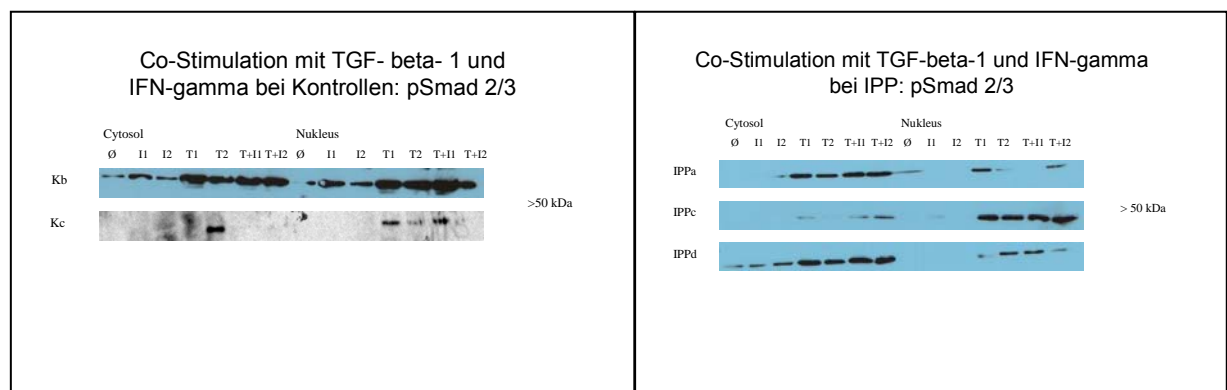
Interferon-gamma inhibiert die TGF-beta-Signaltransduktionskette. Es wird als Medikament zur Behandlung von Fibrosen eingesetzt. Uns interessierte die Wirkung von IFN-gamma bei der IPP. Wir stimulierten Fibroblasten mit TGF-beta-1, IFN-gamma und beiden Cytokinen gemeinsam jeweils für 1 und 2 Stunden. Der gleiche Versuchsansatz wurde mit BMP-2 wiederholt.



## 4. Ergebnisse

### 4.5.3.1. Stimulation mit TGF-beta-1 und IFN-gamma

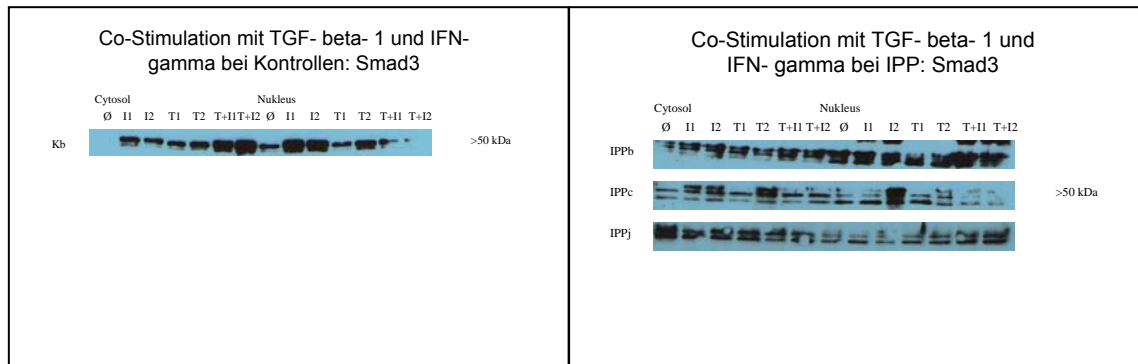
Nach Stimulation mit IFN-gamma zeigten sich schwache Banden an pSmad2/3. Bei alleiniger Stimulation mit TGF-beta-1 war eine höhere Expression von pSmad2/3 nachweisbar. Die Stimulation der Fibroblasten mit TGF-beta-1 und IFN-gamma bewirkte in einigen Zelllinien eine vermehrte Bildung von pSmad2/3. Diese Effekte konnten sowohl bei IPP als auch beim Kontrollkollektiv nachgewiesen werden.



**Abbildung 25 zeigt die Einflüsse der Fibroblasten-Stimulation mit TGF-beta-1, IFN-gamma und beiden gemeinsam auf die Expression von pSmad2/3 bei IPP und Kontrollen.**

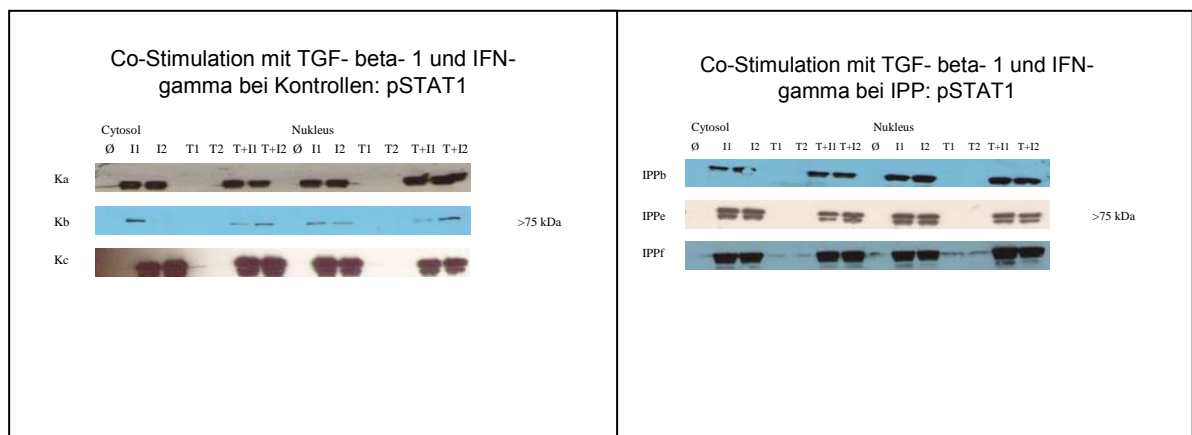
Bei IPP-Fibroblasten hatte die gemeinsame Stimulation von IFN-gamma und TGF-beta-1 keinen reduzierenden Effekt auf die Smad3-Konzentration. Bei den Kontrollen erhöhte sich die Smad3-Menge im Cytosol durch Co-Stimulation mit TGF-beta-1 und IFN-gamma, im Nukleus durch IFN-gamma allein.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 26 zeigt Smad3 nach Fibroblasten-Stimulation mit TGF-beta-1, IFN-gamma und beiden gemeinsam.**

Durch Stimulation der Fibroblasten mit IFN-gamma wird der Transkriptionsfaktor STAT1 phosphoryliert. pSTAT1 war nur bei den mit IFN-gamma stimulierten Zellen nachweisbar. Es gab keine Unterschiede zwischen IPP und Kontrolle.

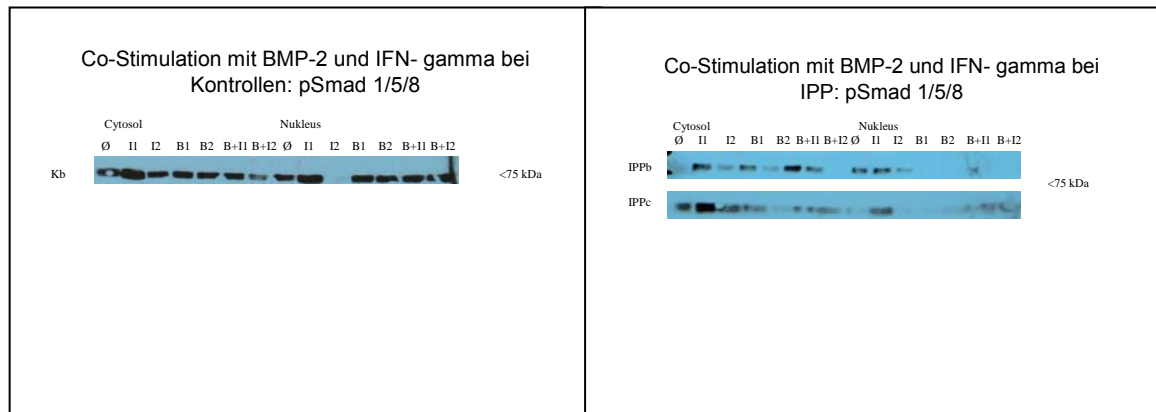


**Abbildung 27 zeigt die Expression von pSTAT1 bei IPP und Kontrollen unter Einfluß von TGF-beta-1, IFN-gamma und beiden gemeinsam.**

## 4. Ergebnisse

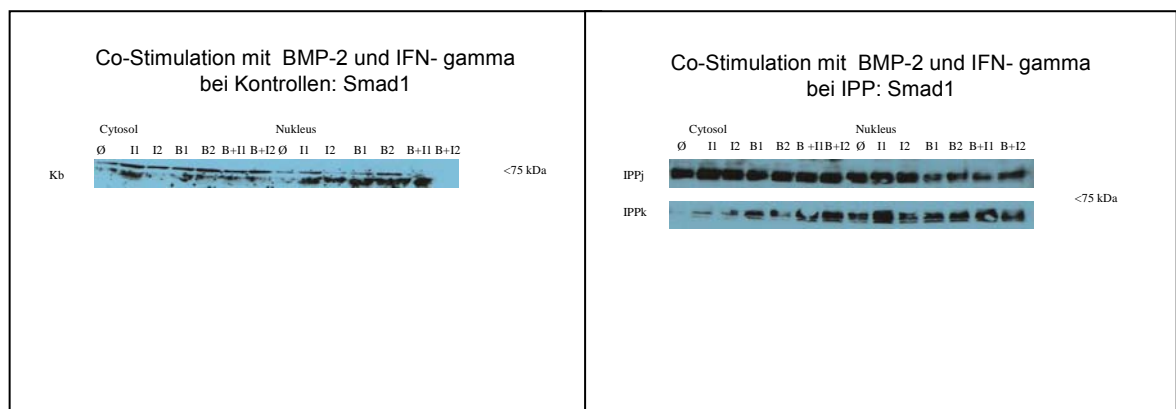
### 4.5.3.2. Stimulation mit BMP-2 und IFN-gamma

Sowohl IFN-gamma als auch BMP-2 bewirkten mindestens eine diskrete Steigerung der pSmad1/5/8-Aktivität. Bei IPP und bei den Kontrollen wirkte die 60 minütige Stimulation mit IFN-gamma als stärkeres Stimulans auf die Smad1/5/8-Konzentration als BMP-2. Die gemeinsame Stimulation mit BMP-2 und IFN-gamma zeigt bei der Kontrolle keine inhibitorische Wirkung.



**Abbildung 28 stellt die pSmad1/5/8 Aktivität bei IPP und Kontrolle dar. Diese wurde beeinflusst durch Zellstimulation mit IFN-gamma, BMP-2 und beiden Stimulantien gemeinsam.**

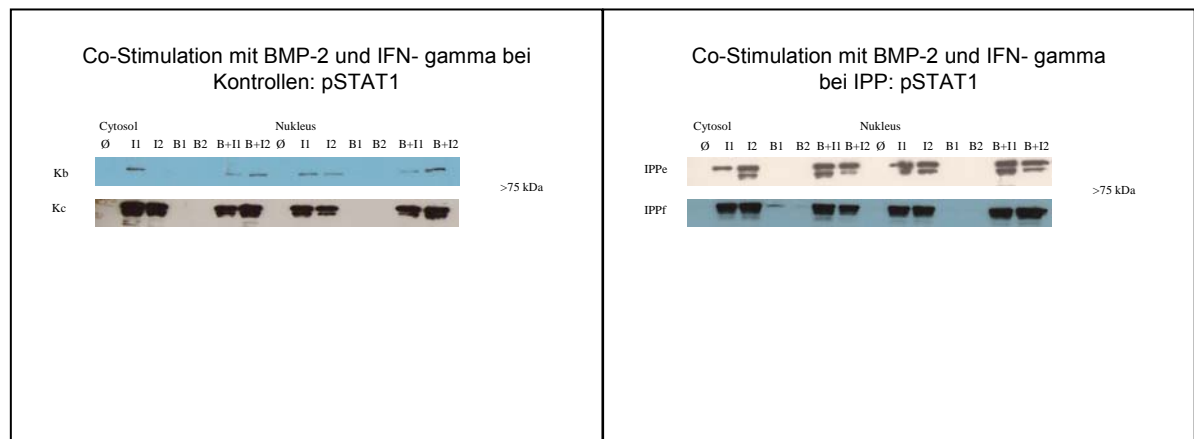
In fast allen cytosolischen und nukleären Extrakten war Smad1 nachweisbar. Es gab keine eindeutige Unterschiede zwischen IPP und Kontrollen.



**Abbildung 29 stellt die Expression von Smad1 nach Zellstimulation durch Stimulation mit IFN-gamma, BMP-2 und beiden zusammen dar.**

## 4. Ergebnisse

Die Stimulation der Fibroblasten mit IFN-gamma bewirkt die Phosphorylierung von pSTAT1. Nur in IFN-gamma-stimulierten Extrakten war pSTAT1 nachweisbar. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen cytosolischem und nukleärem Extrakt. Bei Stimulation mit IFN-gamma und BMP-2 war sowohl bei den IPP-Zelllinien als auch bei den Kontrollen kein inhibitorischer Effekt feststellbar.



**Abbildung 30 zeigt den Einfluß der Zellstimulation von IFN-gamma, BMP-2 und beiden gemeinsam auf pSTAT1 bei IPP und Kontrollen.**

### 4.5.3.3. Vergleich mit dermalen Fibroblasten

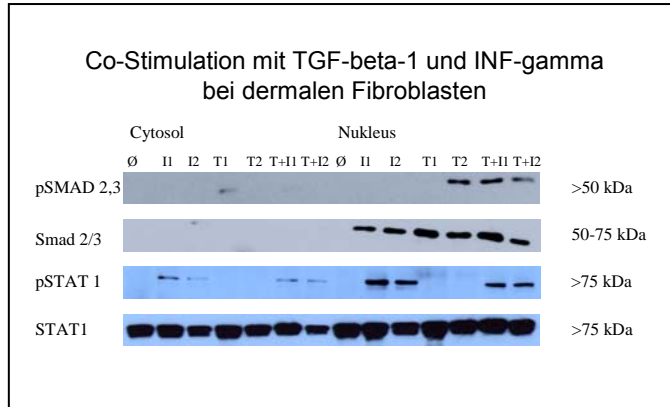
Sowohl die Stimulation mit TGF-beta-1 als auch die Co-Stimulation mit TGF-beta-1 und IFN-gamma erhöhten die Konzentration von pSmad2/3. Dieser Effekt konnte auch bei den tunicalen Fibroblasten beobachtet werden.

Im Gegensatz zu den tunicalen Fibroblasten war bei den dermalen Fibroblasten Smad2/3 nur nukleär nachweisbar. Bei den dermalen Fibroblasten war die Konzentration des Transkriptionsfaktors nach einstündiger Stimulation am höchsten. Dies wurde bei den tunicalen Fibroblasten nicht gefunden.

Bei den tunicalen Fibroblasten war pSTAT1 cytosolisch und nukleär in ähnlichen Bandenstärken nachweisbar, bei den dermalen Fibroblasten vermehrt nukleär. STAT1 zeigte sich bei den dermalen Fibroblasten in allen Extrakten. Nach zweistündiger Stimulation fand bereits wieder ein Abbau statt. Bei den tunicalen Fibroblasten konnte kein eindeutiger Bezug zur zeitlichen Stimulation festgestellt werden.

## 4. Ergebnisse

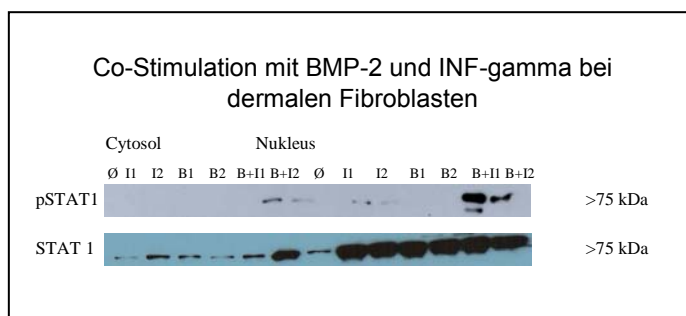
Unter Stimulation durch TGF-beta-1, IFN-gamma und beiden gemeinsam konnten bei penilen und dermalen Fibroblasten unterschiedliche Expressionsmuster bezüglich der Transkriptionsfaktoren gezeigt werden.



**Abbildung 31 zeigt die Westernblots von Extrakten aus dermalen Fibroblasten. Diese wurden zuvor 1 und 2 Stunden mit IFN-gamma, TGF-beta-1 und beiden gemeinsam stimuliert.**

Bei der Co-Stimulation dermalen Fibroblasten mit BMP-2 und IFN-gamma zeigte sich für pSTAT1 und STAT1 überwiegend nukleäre Präsenz. Wie bei den penilen Fibroblasten sank nach 2stündiger Stimulation mit BMP-2 und IFN-gamma die Konzentration an pSTAT1. Die nukleären Banden von STAT1 waren sowohl durch Stimulation von IFN-gamma, BMP-2, als auch beiden gemeinsam, gleich stark vorhanden.

Das Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren unterscheidet sich zwischen dermalen und tunicalen Fibroblasten.



**Abbildung 32 stellt die Westernblots nach Co-Stimulation mit BMP-2 und IFN-gamma bei dermalen Fibroblasten dar.**

### 5. Diskussion

#### 5.1 Basisdaten IPP und Kontrollkollektiv

Das der Untersuchung zugrunde liegende Patientenkollektiv entspricht bezüglich der krankheitstypischen Parameter dem anderer Studien. Das Durchschnittsalter unserer IPP-Patienten lag zum Zeitpunkt der operativen Penisschaftbegradigung bei 54,3 Jahre. In einer Studie von Mulhall et al. waren die Patienten im Mittel  $54 \pm 6$  Jahre alt [78]. Bei der Studie von Cormio et al. waren die Patienten zum Zeitpunkt der Operation mit 58,5 Jahre etwas älter [13]. In einer retrospektiven Studie von Lindsay et al. lag das mittlere Erkrankungsalter bei Diagnosestellung bei 53 Jahre [69], in einer Studie von Kadioglu et al. bei 52,8 Jahren [54]. Sommer und Schwarzer et al. untersuchten 4432 Männer. Davon hatten 142 eine IPP, sie waren im Mittel 57,4 Jahre alt. Die Prävalenz für IPP lag bei 3,2% [100, 109].

Zum Zeitpunkt der Operation sollte die Erkrankung mindestens 1 Jahr bestehen und sich in einer stabilen Phase befinden, um eine postoperative Progression zu vermeiden [123]. In unserer Studie bestand die Erkrankung zum Zeitpunkt der Operation im Durchschnitt 25,2 Monate, bei Mulhall et al.  $20 \pm 4$  Monate [78].

Häufigstes Symptom der IPP ist die Penisdeviation. Sie war in unserer Studie in 81% nach dorsal gerichtet, in der Literatur in 89% beziehungsweise 45,6% [9, 54, 122]. Die Spannweite der Penisdeviation wird mit 20-135° angegeben, im Mittel bei 40° [84, 122]. Bei unseren Untersuchungen kamen deutlich höhere Deviationsgrade von 45-90°, im Durchschnitt 67,5° vor. Zu berücksichtigen ist jedoch, daß nur die Patienten in die Studie einfließen, die sich für eine operative Penisschaftbegradigung entschieden hatten. Eine Penisdeviation unter 30° beeinträchtigt kaum die Ausübung von Geschlechtsverkehr, bei einer Deviation von >90° ist dieser in der Regel nicht mehr praktikabel [122]. In Mulhall's Studie flossen 5 Patienten mit IPP ein. Diese hatten eine mittlere Penisdeviation von  $40 \pm 10^\circ$  [78].

Neben Plaque, Penisdeviation und penile Schmerzen tritt im Laufe der Erkrankung bei ca. 30% der Betroffenen eine erektile Dysfunktion hinzu [70, 100, 109, 122]. Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen. Es hatten insgesamt 32% der Patienten eine leichte Erektionsstörung mit einem maximalen Erektionsgrad von E4 (volle Tumescenz, mittlere Rigidität) und E4-5 (volle Tumescenz, mittlere-volle

## 5. Diskussion

Rigidität). Kadioglu et al. berichtet von 54,4% der IPP-Patienten, die sich über eine erektile Dysfunktion beklagen [54].

Das Kontrollkollektiv war in unserer Studie deutlich jünger als die IPP-Gruppe. Zu dieser Gruppe gehörten Patienten mit genuiner Penisdeviation, die im Durchschnitt 23 Jahre alt waren. Die Patienten, die eine Penisprothese erhielten, waren im Mittel 51,4 Jahre alt. Aufgrund der geringen Patientenzahl konnte keine Altersgleichheit beider Gruppen erzielt werden.

### 5.2 Zellkultur

In der Literatur werden häufig Fibroblasten aus humanem Präputium gezüchtet. Die Vorhäute stammen bei einigen Studien von Neugeborenen [79, 80], bei einigen von Adulten [78]. Es werden auch Gewebeproben aus vermeintlich gesunder Tunica albuginea bei IPP-Patienten entnommen [105]. Unser Vergleich der Experimente mit dermalen Fibroblasten aus Vorhäuten und Fibroblasten aus der Tunica albuginea penis beziehungsweise dem IPP-Plaques zeigten unterschiedliche Expressionsmuster der Smads in der TGF-beta-Signaltransduktionskette. In einer Studie von Holterhus et al. wird postuliert, daß Fibroblasten entsprechend ihrer unterschiedlichen Herkunft oder unterschiedlichem Entwicklungsmilieu verschiedene Expressionsmuster haben [51]. Entsprechend diesen Ergebnissen müssen Studien, in denen präputiale Fibroblasten als Kontrolle eingesetzt wurden, kritisch betrachtet werden.

Zellkulturen wurden von allen Gewebeproben angelegt. Fibroblasten wuchsen bei 10 von 16 IPP-Patienten und 5 von 7 Kontrollen aus. Das Problem des Anzüchtens ist in der Literatur bekannt. Bei Mulhall et al. sind bei 5 von 10 Plaquesbiopsien Fibroblasten gewachsen [78], bei Somers et al. 19 von 23 [105]. Insgesamt sind die Zahlen von IPP- und Kontrollgruppe gering. Mulhall et al. legten in 3 verschiedenen Studien Zellkulturen von 4 Patienten mit IPP versus 2 Kontrollen, 5 IPP-Patienten versus 4 Kontrollen und 10 IPP versus 8 Kontrollen an [78, 79, 80]. Somers et al. konnte von 23 IPP-Patienten Biopsate gewinnen [105]. Eine Kontamination der Zellen ist eher die Ausnahme, häufiger wachsen keine Fibroblasten aus dem Gewebe aus. Vielleicht wurde die Biopsie aus makroskopisch nicht sichtbarer verkalkter Plaquerregion gewonnen.

### 5.3 RT-PCR

Wir untersuchten die mRNA-Expression von Smad1, 2, 3, 4, 5 und 7. Dabei zeigten sich bei 2 von 6 IPP-Proben erniedrigte Spiegel von Smad2. Die Smad3-Expression war bei IPP etwas stärker als bei der Kontrolle. Smad 4 wurde nicht bei allen IPP gleich stark exprimiert, aber insgesamt stärker als bei den Kontrollen. Die erhöhte Smad3 Expression bei IPP läßt einen Zusammenhang mit der TGF-beta-1-Signaltransduktion als möglicher pathogenetischer Faktor vermuten. Smad7 wurde bei Kontrollen und IPP unterschiedlich stark exprimiert. Magee et al. führten DNA-Microarrays bei IPP durch. Diese Gruppe beschrieb eine Down-Regulation von Smad7 bei IPP [73]. Im Gegensatz hierzu wurde bei Sklerodermie-Fibroblasten eine starke Smad7-Expression bei fehlender Expression der normalen dermalen Fibroblasten beschrieben. Die Versuche dieser Arbeitsgruppe belegen eine gestörte negative Regulation des TGF-beta-1-Signalweges bei Sklerodermie [3].

### 5.4 Mikroskopie

#### 5.4.1 Morphologie

In der Literatur wurden morphologische Unterschiede zwischen Fibroblasten aus IPP-Plaques und gesunder Tunica albuginea des Kontrollkollektivs beschrieben. In der Studie von Somers et al. werden die aus dem Plaque gezüchteten Fibroblasten sowohl als rund und fibroblastisch sowie als spindelförmig mit langen cytoplasmatischen Ausläufern beschrieben. Sie wuchsen als Monolayer kreuz und quer. Fibroblasten der Kontrollgruppe mieden Berührung anderer Fibroblasten und wuchsen geordneter [105]. Im Gegensatz hierzu beschreiben Mulhall et al. die Fibroblasten aus IPP-Plaques als Zellen mit plumpem, eher rundem Zellkörper mit cytoplasmatischen Ausläufern, die im Random-Muster wuchsen. Fibroblasten aus gesunder Tunica albuginea wuchsen parallel, in engen Zellhaufen mit wirbeligen Strukturen [78, 79, 80]. Die von uns gezüchteten Zellen waren alle eher spindelförmig mit cytoplasmatischen Ausläufern. Morphologische Unterschiede zwischen Fibroblasten aus dem Plaque und gesunder Tunica albuginea fielen uns nicht auf.



### 5.4.2 Immunofluoreszenz-Mikroskopie

#### 5.4.2.1 Fibroblastennachweis

Die Reinheit der Fibroblastenkultur wurde in unserer Studie durch immunofluoreszierende Antikörper nachgewiesen. Die Fibroblasten waren negativ für Panzytokeratin. Die Färbung schloss das Wachstum von Epithelzellen in der Zellkultur aus. Bei den kultivierten Fibroblasten waren schwache Signale für alpha-smooth-muscle-actin sichtbar. Dies deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Kontrollen zur Charakterisierung der gezüchteten Zellen. Mulhall et al. führten eine Immunofluoreszenz-Färbung der Zelllinien durch. Alle Zellen zeigten starke Signale bei Anti-Vimentin-Antikörpern. Schwache cytoplasmatische Signale wurden nach Inkubation mit smooth-muscle-actin beschrieben. Die in Kultur gehaltenen Zellen waren negativ für Cytokeratin und Desmin-Expression [78, 80]. Somers et al. färbten die Zellen nur mit alpha-smooth-muscle-actin. Es wurden stärkere Signale bei IPP-Fibroblasten im Gegensatz zur Kontrolle gefunden. Er folgerte daraus ein erhöhtes Vorkommen von Myofibroblasten bei IPP [105].

#### 5.4.2.2 Smads

In unseren Experimenten fanden wir eine Translokation von Smads in den Zellkern nach Stimulation mit TGF-beta-1. Nach 15 minütiger Stimulation waren Smad1/2/3 sowohl bei IPP als auch Kontrolle nukleär nachweisbar. Der Rücktransport der Smads erfolgte bei den Kontrollen nach 30 min, bei IPP später. Da die Zellen maximal 60 min stimuliert wurden, ist eine Aussage über den Zeitpunkt des Rücktransports nicht möglich. Smad2/3 translozierten nach 15 bis 30 min in den Zellkern. Bei der Kontrolle war keine komplette Translokation nachweisbar. Die Translokation von Smad4 fand bei unseren aus dem Plaque gewonnenen Fibroblasten nach 30 minütiger TGF-beta-1-Stimulation statt. Bei den Kontrollen fanden wir die Translokation bereits nach 15 min.

Nach Stimulation der Fibroblasten mit BMP-2 zeigte sich in unseren Versuchen eine Translokation von Smad1/2/3 nach 15 min, ein Rücktransport nach 60 min. Dieser Rücktransport war bei der Kontrollgruppe vollständiger als bei IPP. Smad1 fanden wir bei Fibroblasten des IPP-Gewebes nur zwischen 15-30

## 5. Diskussion

min im Nukleus. In der Kontrollgruppe war Smad1 als nukleäre und perinukleäre Anreicherung sichtbar. Smad4 fanden wir nach 30minütiger BMP-2-Stimulation, peri- und nukleär. Der Rücktransport begann nach 60 min.

Soweit uns bekannt ist, wurde die Translokation der Smads bei Fibroblasten aus dem IPP-Plaques bislang nicht untersucht.

Bei Mäuse-Fibroblasten (NIH-3T3) zeigte die Gruppe um Eickelberg eine Translokation von Smad2 und Smad4 nach TGF-beta-Stimulation. Die ersten Effekte waren nach 2minütiger Stimulation nachweisbar [26].

### 5.5 Westernblot

#### 5.5.1 Zeitreihen-Stimulation mit TGF-beta-1, BMP-2 und IFN-gamma

Nach Fibroblastenstimulation mit TGF-beta-1 war in unseren Experimenten nach 15 min eine Phosphorylierung von Smad2/3 nachweisbar. Das Maximum der pSmad2/3-Aktivierung wurde nach 60 min festgestellt. Die gleichen Ergebnisse fanden wir für Smad2/3 in der IPP-Gruppe. Beim Kontrollkollektiv fand der Abbau von Smad2/3 bereits nach 30 min statt. Dies läßt vermuten, daß die Regulationsmechanismen bezüglich der TGF-beta-Signaltransduktionskette bei IPP verändert sind. Ein verzögerter Abbau der Transkriptionsfaktoren bewirkt eine vermehrte Expression an TGF-beta-1 vermittelten Proteinen. In weiteren Experimenten sollte das Verhalten von Smad7 als inhibitorisch wirkender Faktor untersucht werden.

Nach unseren Kenntnissen wurden die Transkriptionsfaktoren Smad bisher in der Literatur bei IPP nicht untersucht. Kim et al. fanden bei Fibroblasten aus chronischen Wunden eine erniedrigte pSmad2/3 Konzentration im Vergleich zu normalen dermalen Fibroblasten. Nach 30 minütiger TGF-beta-1-Stimulation stieg die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 bei den chronischen Ulkus-Fibroblasten auf mehr als das 3fache an. Bei normalen Fibroblasten war die Antwort auf die Stimulation noch ausgeprägter. Kim et al. stimulierten die Fibroblasten nur 30 min, es wurde keine Zeitreihe angelegt [58]. Auch in unseren Versuchen stieg die Phosphorylierung von Smad2/3 nach TGF-beta-1-Stimulation auf ein Vielfaches an. Im Gegensatz zu den Fibroblasten aus chronischen Wunden, bei denen die Antwort auf TGF-beta-1 reduziert war, reagierten die IPP-

## 5. Diskussion

Fibroblasten stärker auf das Stimulans als Fibroblasten gesunder Tunica albuginea.

Ein Vergleich der Expression von Smad2, Smad3, Smad4 und Smad7 bei normalen und Sklerodermie-Fibroblasten wurde von Asano et al. durchgeführt [3]. Bei den nichtstimulierten Zellen wurden keine unterschiedlichen Expressionen von Smad2, Smad3 und Smad4 festgestellt. Die Smad7-Expression war bei Sklerodermie-Fibroblasten deutlich erhöht [3].

Kretschmer et al untersuchten bei der kompetenten humanen Zelllinie HaCaT Keratinozyten die Regulation der TGF-beta-Signaltransduktion durch Smad2, Smad3 und Smad4 [60]. Sie stellten fest, daß TGF-beta-1 seinen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von humanen HaCaT Keratinozyten hauptsächlich über Smad3 vermittelt. Die Hemmung der Smad3-Expression supprimierte am stärksten die TGF-beta-1-vermittelte Wachstumshemmung. Die Wirkung der Smad4-Hemmung war geringer als die der Smad3-Inhibition. Die Inhibition der Smad2-Expression hatte keine Auswirkung. Bei der Versuchswiederholung mit humanen Epithelzellen aus der Brust MCF-10A hatte die Inhibition von Smad 2, Smad3 und Smad4 jeweils ähnliche Effekte. Die Gruppe um Kretschmer zeigte, daß die Smads bei verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Rollen spielen. [60]

Wir stimulierten aus IPP-Plaques und gesunder Tunica albuginea kultivierte Fibroblasten mit BMP-2 über 0, 15, 30, 60 und 120 min. Über BMP-2-Rezeptoren kommt es zur Aktivierung von pSmad1/5/8. Das Maximum der Phosphorylierung war bei der Kontrollgruppe nach 15 min im Cytosol und nach 60 min im Nukleus erreicht. Die IPP-Fibroblasten verhielten sich untereinander kontrovers. Total Smad1 wurde im cytosolischen und nukleären Extrakt über die gesamte Zeitreihe von 0-120 min ähnlich stark exprimiert. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Soweit uns bekannt ist wurden bislang keine aus IPP-Gewebe gewonnene Fibroblasten mit BMP-2 stimuliert.

In unseren Experimenten erfolgte die Stimulation von Fibroblasten aus der IPP- und Kontrollgruppe mit IFN-gamma über 0, 15, 30, 60 und 120 min. Sowohl pSTAT1 als auch STAT1 waren in allen stimulierten Proben gleichermaßen nachweisbar. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen IPP und Kontrollkollektiv.

Eine Zeitreihen-Stimulation mit IFN-gamma ist nach unserem Kenntnisstand bisher in der Literatur nicht beschrieben.

### 5.5.2 Co-Stimulation mit IFN-gamma

Interferon-gamma scheint auf die Pathogenese der IPP einen Einfluß zu haben. In den Untersuchungen der Tübinger Arbeitsgruppe wurden bei IPP-Patienten signifikant erhöhte Serumspiegel von IFN-gamma und TGF-beta-1 bei gleichzeitig signifikant erniedrigten Spiegeln von Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) und Fibroblast Growth Factor basic (bFGF) gefunden. Dies könnte auf eine Hemmung der Fibroblastenproliferation und der Kollagenproduktion hinweisen. IFN-gamma gilt als Marker für die Fibroblastenproliferation, TGF-beta-1 als Fibrose-Induktor [31, 127]. Nach IFN-gamma-Stimulation von Zellkulturen aus humanen Schwellkörperzellen wurde eine Reduktion von Kollagen I und III nachgewiesen [1]. Isoformen von Interferon werden in der Therapie von Fibrosen, u.a. bei IPP eingesetzt. Interferon-alpha-2b wird zur intraläsionalen Infiltrationstherapie bei IPP angewandt [62]. In einer Studie von Duncan et al. wurden Zellkulturen aus IPP-Fibroblasten mit hu-r-IFN-alpha<sub>2b</sub> (human recombinant Interferon-alpha-2b), hu-r-IFN-beta-ser<sub>17</sub> und hu-r-IFN-gamma stimuliert. Hu-r-IFN-alpha<sub>2b</sub> und hu-r-IFN-beta-ser<sub>17</sub> hatten keinen Einfluß auf Fibroblasten Glycosaminoglycan oder die Fibronektin Produktion, während hu-r-IFN-gamma beide Spiegel signifikant erhöhte. Die Ergebnisse verdeutlichen, daß IFNs-alpha und-beta einen breiteren antifibrotischen Effekt auf IPP-Fibroblasten haben als IFN-gamma [22]. Bei der Lungenfibrose wird die antifibrotische Wirkung von Cyclosporin A und IFN-gamma therapeutisch genutzt. In in vitro Experimenten wurde belegt, daß sie potente Antagonisten der TGF-beta- Aktivität sind [23].

In unseren Experimenten zeigten sich im Westernblot nach Stimulation mit Interferon-gamma schwächere Banden als nach TGF-beta-1-Stimulation. Ulloa et al. zeigten bei der U4A Zelllinie, einer Jak1-Mangelmutante, daß nach einer kurzen Inkubation mit IFN-gamma die TGF-beta-induzierte Phosphorylierung von Smad3 inhibiert wird. [111]. Die Arbeitsgruppe um Kuga untersuchte Zellkulturen einer humanen Magenkarzinom-Zelllinie GCTM-1 und einer humanen Fibroblasten-Zelllinie TIG-1-20. Sie zeigten, daß IFN-gamma die Phosphorylierung von Smad2/3 und die nukleäre Translokation des Smad2/3-Smad4-Komplexes in Anwesenheit von TGF-beta inhibiert [61]. Die gemeinsame Stimulation von Interferon-gamma und TGF-beta-1 erzielte in unseren Experimenten keinen inhibitorischen Effekt auf pSmad2/3. In einigen Zelllinien von IPP und Kontrollen wurde durch die Co-Stimulation die Konzentration an pSmad2/3 verstärkt.

## 5. Diskussion

Bei IPP-Fibroblasten hatte die gemeinsame Stimulation von IFN-gamma und TGF-beta-1 keinen reduzierenden Effekt auf die Smad3-Konzentration. Bei den Kontrollen erhöhte sich die Smad3-Menge im Cytosol durch Co-Stimulation mit TGF-beta-1 und IFN-gamma, im Nukleus durch IFN-gamma allein. In den Experimenten von Ulloa et al. verringerte sich die Konzentration von Smad3 nach Stimulation der U4A Zelllinien mit IFN-gamma und TGF-beta gemeinsam [111].

In Studien von Eickelberg et al. wurden Zellkulturen humaner Lungen-Fibroblasten angelegt. Nach Stimulation mit IFN-gamma konnte nach 60 min ein rapider Anstieg der STAT1-Aktivierung nachgewiesen werden. Dieser Effekt hielt bis zu 6 Stunden nach IFN-gamma-Exposition an [23].

Wir führten in unseren Versuchen eine Co-Stimulation der Fibroblasten mit BMP-2 und IFN-gamma durch. Dabei konnte kein antagonistischer Effekt von IFN-gamma nachgewiesen werden. Soweit uns bekannt ist, wurden bislang noch keine Ergebnisse zur Stimulation mit BMP-2 von Fibroblasten aus dem Plaque publiziert.

### 5.5.3 Vergleich mit dermalen Fibroblasten

In unseren Experimenten zeigten dermale Fibroblasten und Fibroblasten aus dem IPP-Plaque ein unterschiedliches Verhalten auf TGF-beta-1-, BMP-2- und IFN-gamma-Stimulation. Die pSmads waren bei den dermalen Fibroblasten überwiegend nukleär, bei den penilen Fibroblasten cytosolisch und nukleär nachweisbar. Die maximale Konzentration der Transkriptionsfaktoren nach Stimulation fand sich bei dermalen Fibroblasten nach einer Stunde, bei penilen Fibroblasten überwiegend nach zwei Stunden.

Diese Versuche wurden bislang in der Literatur nicht beschrieben. Die Expressionsspiegel nach 30minütiger TGF-beta-1 –Stimulation wurden via Westernblot bei dermalen und Sklerodermie-Fibroblasten untersucht. Asano et al. konnten keine Unterschiede zwischen diesen Gruppen bezüglich Smad2, Smad3 und Smad4 feststellen. Es wurden nur Gesamtproteinextrakte erstellt und nur eine Stimulationsdauer von 30 min gewählt [3].

Es liegen einige Studien von der Gruppe Somers et al. vor, bei denen Zellkulturen aus Gewebe des Plaques, der umgebenden Tunica albuginea und der Haut angelegt wurden. In diesen Studien verhielten sich die Kontrollen aus Tunica albuginea und Haut bezüglich chromosomalen Anomalien und

## 5. Diskussion

Kollagencharakterisierung gleich [106, 108]. Holterhus et al. postulierten, daß Fibroblasten entsprechend ihrer unterschiedlichen Herkunft oder unterschiedlichem Entwicklungsmilieu verschiedene Smad-Expressionsmuster haben [51].

Die meisten Forschungsgruppen, die sich mit IPP beschäftigen, wählen bei der Zellkultur als Kontrolle Fibroblasten von Vorhäuten. Zum Teil werden adulte, zum Teil neonatale Vorhäute verwendet [78, 79, 80]. Für unsere Experimente nahmen wir kommerzielle dermale Fibroblasten, die aus humanen Vorhäuten kultiviert wurden. Es zeigten sich unterschiedliche Expressionsmuster der TGF-beta-Signaltransduktionskette. Der Vergleich mit Fibroblasten aus Vorhäuten muß kritisch betrachtet werden.

Die Hypothese, daß die IPP durch eine Fehlregulation in der TGF-beta-Signaltransduktionskette entsteht, wurde in vorangegangenen Studien nicht eindeutig geklärt. In Anbetracht der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse der Beeinflussung von Transduktionsfaktoren nach TGF-beta-1 Stimulation wird die vorliegende Hypothese unterstützt.

Sowohl auf zellulärer, Protein- und RNA-Ebene lassen sich Unterschiede der TGF-beta Signaltransduktionskette zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv nachweisen. Die entsprechenden Transduktionsfaktoren sind nach TGF-beta-1 Stimulation im IPP-Plaque stärker nachweisbar als im Kontrollgewebe. Zu den Regulationsmechanismen über Feedback und Crosstalk-Kontrollen müssen weitere Untersuchungen folgen.

Zur Therapie von fibrotischen Erkrankungen wird Interferon-gamma aufgrund seiner antifibrotischen Wirkung insbesondere bei Lungenfibrosen erfolgreich angewandt. Diese Wirkung konnte in den Untersuchungen an Gewebe aus dem IPP-Plaque nicht bestätigt werden. Um einen kausalen Therapieansatz für die Induratio penis plastica zu finden muß die exakte Ätiopathogenese der IPP weiter erforscht werden.

### 6. Zusammenfassung

Die Induratio penis plastica (IPP, Peyronie's disease) ist eine Erkrankung der penilen Tunica albuginea mit Bildung eines fibrotischen Plaques. Die IPP tritt überwiegend zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr auf und betrifft ca. 0,4-3,2% der männlichen Bevölkerung. Häufig besteht die Symptomentrias Plaque, Penisdeviation und penile Schmerzen. Die Diagnose wird durch eine ausführliche Anamnese, Palpation des Penis und die penile Sonographie gestellt. In der Frühphase der Erkrankung kann ein medikamentöser Therapieversuch gestartet werden. Dieser führt selten zum Erfolg. In der stabilen Erkrankungsphase kann eine operative Penisschaftbegradigung durchgeführt werden. Zum Zeitpunkt der Operation sollte die Erkrankung vor mindestens einem Jahr begonnen haben und seit mindestens 6 Monate eine Schmerz- und Progressionsfreiheit bestehen.

Die Ätiopathogenese der IPP ist unklar. Es werden (mikro)-traumatische, genetische, immunologische, entzündliche, degenerative und medikamentöse Ursachen diskutiert. Nach neuestem Kenntnisstand ist die Hypothese der rezidivierenden Mikrotraumen am wahrscheinlichsten. Eine Abknickung des Penis beim Geschlechtsverkehr kann zu kleinsten Einrissen vor allem in der dorsalen Tunica albuginea mit konsekutiver Entzündungsreaktion und Bildung von exzessiven Kollagen- und Fibrinablagerungen mit Plaquebildung, führen. Im fortgeschrittenen Stadium tritt in einem Drittel der Fälle eine Verkalkung des Plaques auf. Es wird vermutet, daß es eine bislang noch unbekannte genetische Determinante gibt, die die Entstehung der IPP mit beeinflußt. Diese These basiert unter anderem auf der Beobachtung, daß bei ca. 30% der IPP-Patienten gleichzeitig ein M. Dupuytren besteht.

Untersuchungen des Plaquegewebe der Tunica albuginea bei IPP-Patienten ergaben eine Zunahme von Kollagen I und III sowie erhöhte Spiegel an TGF-beta-1 (transforming-growth-factor-beta-1). In einem Tiermodell wurde nach subtunicaler Injektion von Cytomodulin eine vermehrte TGF-beta-Expression und IPP-typische histomorphologische Veränderungen nachgewiesen.

Auf dem Boden dieser in der Literatur beschriebenen Ergebnisse wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit die Signaltransduktionskette von TGF-beta-1 als möglicher pathogenetischer Faktor der IPP untersucht.

## 6. Zusammenfassung

Aus den Plaques von 16 Patienten mit IPP sowie aus der Tunica albuginea von 7 nicht von IPP betroffenen Männern wurde Gewebe entnommen und Zellkulturen angelegt. Als unabhängige Kontrolle wurden kommerzielle dermale Fibroblasten, die aus humaner Vorhaut stammen, mitgeführt. Die Transkriptionsfaktoren Smads wurden auf RNA-, Protein- und Zellebene untersucht. Nach Stimulation der Fibroblasten mit TGF-beta-1 (transforming growth factor-beta-1) oder BMP-2 (bone morphogenetic protein) werden Smads aktiviert. Diese bilden mit Smad4 einen Komplex, wandern in den Zellkern und lösen dort die Transkription von mRNA aus.

Die Expression von Smad3 und Smad4 war bei der IPP tendenziell stärker als beim Kontrollkollektiv. Smad3 wird durch Bindung von TGF-beta-1 an seine Rezeptoren aktiviert. Nach Bindung an den CoFaktor Smad4 transloziert der Komplex zur Auslösung der Transkription in den Nukleus. Dies läßt vermuten, daß TGF-beta-1 einen Einfluß auf die Pathogenese der IPP hat.

Auf zellulärer Ebene wurde durch Immunofluoreszenz-Mikroskopie gezeigt, daß nach Stimulation der Fibroblasten mit TGF-beta-1 nach 15-30 min der Transkriptionsfaktor Smad3 in den Nukleus translozierte. Dieser Vorgang war bei IPP-Fibroblasten ausgeprägter als beim Kontrollkollektiv. Der für die Translokation notwendige Co-Faktor Smad4 wanderte auch 15-30 min nach Stimulation mit TGF-beta-1 in den Zellkern. Hier fand die Translokation im Kontrollkollektiv etwas früher als bei IPP statt. Nach 60 min konnte noch kein wesentlicher Abbau festgestellt werden. Bei den Kontrollen zeichnete sich eine schnellere Translokation in den Nukleus ab. Die Wirkung der Smads wurde durch einen schnelleren Abbau jedoch limitiert. Dies könnte die Entstehung der fibrotischen Plaques bei IPP beeinflussen.

Die Fibroblasten-Stimulation mit BMP-2 bewirkt die Aktivierung von Smad1. Die Translokation in den Nukleus wurde nach 15 min, der Abbau und Rücktransport ins Cytosol nach 30 min, nachgewiesen. Bei den Kontrollen zeigte sich eine peri- und nukleäre Anreicherung. Die Stimulation der Fibroblasten mit BMP-2 scheint eine geringere Wirkung zu haben, da die Smads früher als nach TGF-beta-1-Stimulation abgebaut werden.

Auf Proteinebene konnten in unseren Westernblot-Versuchen ähnliche Ergebnisse erzielt und die Ergebnisse auf Zellebene bestätigt werden. Nach Zellstimulation mit TGF-beta-1 kommt es nach 15-60 min zur Aktivierung von Smad2/3. Beim



## 6. Zusammenfassung

Kontrollkollektiv erfolgte die nukleäre Translokation schneller bei früherem Abbau und somit Verkürzung der Wirkung.

Eine Stimulation der Fibroblasten mit BMP-2 führte zu keinem Einfluß auf Smad1. Eine Zellstimulation mit TGF-beta-1 und IFN-gamma hat keinen antagonistischen Einfluß auf Smad2/3. Durch die Co-Stimulation steigt in einigen IPP- und Kontroll-Zelllinien die Expression von Smad2/3. Diese Ergebnisse widerlegen eine antifibrotische Wirkung von IFN-gamma, als Antagonist von TGF-beta-1.

Auf Proteinebene wurden in unseren Experimenten die Smads bei dermalen, aus der Vorhaut kultivierten Fibroblasten, untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen der tunicalen Fibroblasten verglichen. Da es schwer ist, Biopsien aus der Tunica albuginea von gesunden Personen zu erhalten, werden in der Literatur häufig Zellkulturen aus Vorhaut als Kontrolle angelegt. Unsere Ergebnisse zeigen, daß sich dermale und tunicale Fibroblasten in Bezug auf die TGF-beta-Signaltransduktionskette unterschiedlich verhalten. Studien, in denen als Kontrollkollektiv präputiale Fibroblasten verwendet wurden, müssen kritisch hinterfragt werden.

Aufgrund der unterschiedlich schnellen Translokation von Smads nach TGF-beta-Fibroblastenstimulation bei IPP und Kontrollen kann ein Zusammenhang zwischen der IPP und einer Störung in der TGF-beta-Signaltransduktionskette nahegelegt werden. Insbesondere Smad2/3 und die aktivierte Form pSmad2/3 translozieren nach TGF-beta-Stimulation bei IPP-Fibroblasten schneller in den Zellkern und verbleiben dort länger als bei den Kontrollen. Im Nukleus löst der Smad-Komplex die Transkription von Proteinen aus. Die Expression von Smad3 und Smad4 ist aus IPP-Plaques-Fibroblasten isolierter RNA höher als bei Kontroll-RNA. Die Ergebnisse sind auf RNA-, Protein- und Zellebene ähnlich und unterstützen die These, daß eine Störung in der TGF-beta-Signaltransduktionskette für die Entstehung der IPP verantwortlich sein könnte.

Weitere Untersuchungen zum genauen Pathomechanismus der IPP sind notwendig.

### 7. Englische Zusammenfassung (Summary)

Peyronie's disease (PD) is an acquired disease of the penile tunica albuginea typified by the development of a fibrotic plaque. In most cases the onset of the disease is during the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> decade of life. Between 0,4-3,2% of male inhabitants are affected by Peyronie's disease. Patients suffer from the typical trias of penile plaque, penile curvature, and local pain. Diagnostic tools are based on post-med. history, palpation, and ultrasonography of the penis. A therapeutic attempt can be performed with oral drugs during the early stage of the disease. Only in a few cases this conservative therapy is successful. The surgical management of the disease aims on correcting the penile curvature. The disease should last at least for 12 months before surgery is considered. It is recommended that the patient should be free of pain and progression over a period of 6 months.

The etiopathogenesis of PD is still unclear. (Micro)-traumatic, genetic, immunologic, inflammatory, degenerative, and drug-induced causes are discussed. Conferred to the latest literature the hypothesis of microtrauma is the most likely one. During sexual intercourse the penis can bend. This leads to rupture of the tunica albuginea with consecutive inflammation und development of excessive deposition of collagen and fibrin. In one third of the cases the plaque calcifies in the chronic stage of PD. An unknown additive genetic disposition is supposed. This thesis is based on the fact that about 30% of the patients with PD suffer from Dupuytren's contracture.

An increase of collagen I and III as well as increased levels of TGF-beta-1 (transforming growth factor) have been described in patients with PD. Cytoomodulin was injected in the tunica albuginea of rats in an animal model. This caused an increased expression of TGF-beta-1 and formation of PD-like plaque with its typical histomorphologic alterations.

Based on this results this doctoral thesis has investigated the pathway of TGF-beta-1 as a potential pathogenetic factor of PD.

Biopsies were taken from the plaques of 16 patients suffering from PD as well as from tissue from tunica albuginea of 7 patients without PD. Cell culture was initiated from this tissue. Commercial dermal fibroblasts derived from foreskin were cultured as an independent control. The transcriptional factors Smads were investigated on RNA-, protein- and cellular level. After stimulation of fibroblasts

## 7. Englische Zusammenfassung (Summary)

with TGF-beta-1 (transforming growth factor-beta-1) or BMP-2 (bone-morphogenetic-protein) Smads were activated through phosphorylation. After binding with Smad4 the complex can translocate in the nucleus and initiate the transcription of mRNA.

The RNA-expression of Smad3 and Smad 4 was increased in patients suffering from PD. After binding of TGF-beta-1 at its receptors Smad3 will be activated. The phosphorylated Smad3 binds a complex with Smad4 and translocates into the nucleus, where the complex initiates transcription. We suppose that TGF-beta-1 has an influence on the pathogenesis of PD.

It was shown by immunofluorescence microscopy that Smad3 translocates into the nucleus 15-30 minutes after stimulation with TGF-beta-1 on a cellular level. This effect is stronger and the onset is earlier in plaque-derived fibroblasts from PD than in the control group. The translocation of Smad4 into the nucleus was found after 15-30 minutes. It was earlier in the control group but the retransport into the cytosol was also earlier. The effect of Smad4, together with other activated Smads, was elongated in the group of PD. This could effect the origin of this disease.

Stimulation of fibroblasts with BMP-2 also resulted in increased levels of activated Smad1. Smad1 translocated in the nucleus 15 minutes after stimulation. The retransport into the cytosol was performed after 15 minutes in PD-fibroblasts. In the controls peri- and nuclear enrichment was seen. We suppose that BMP-2 has less effects on the penile fibroblasts compared to TGF-beta-1. The Smads return earlier back to cytosol after BMP-stimulation than after TGF-beta-stimulation.

On the protein level the Westernblot analysis were similar to that of RNA and cellular level. The translocation of pSmad2/3 was found 15-60 minutes after stimulation with TGF-beta-1. It was earlier in control group but therefore the retransport started earlier. This limits the effect. Stimulation of the fibroblasts with BMP-2 did not lead to any special effect to Smad1.

Stimulation of the fibroblasts with TGF-beta-1 and IFN-gamma did not show any antagonistic effect on Smad2/3. In some of the tested cell lines from PD and controls expression of Smad2/3 was even increased after co-stimulation. This refutes to the known antifibrotic effect of IFN-gamma as an antagonist of TGF-beta.

## 7. Englische Zusammenfassung (Summary)

We have compared our results from fibroblasts derived from tunica albuginea and plaque with that of dermal fibroblasts from foreskin. In other cell culture based studies foreskin fibroblasts are used frequently for control of PD. Our investigations have shown that preputial cells differ in the TGF-beta-pathway compared to fibroblasts from tunica albuginea. Consequently, all investigations on PD-fibroblasts compared with foreskin derived fibroblasts should be discussed critically.

A connection between PD and alterations of the TGF-beta-pathway can be supposed based on the fact of varying speed of Smad-translocation after stimulation with TGF-beta. Smad2/3 and the activated form pSmad2/3 translocate earlier after TGF-beta stimulation in fibroblasts of PD than in controls. They remain longer in nucleus than controls. In the nucleus the Smad-complex resolves transcription of proteins. RNA-Expression of Smad3 and Smad4 is higher in PD derived fibroblasts in contrast to RNA from controls. The results are similar on a RNA-, protein- and cell-level. These findings support the hypothesis that alterations in the TGF-beta-pathway contribute to the pathogenesis of PD.

Further studies will be necessary to inquire into the exact pathogenesis of Peyronie's disease.

### 8. Literaturverzeichnis

1. Ahuja SK, Sikka SC, Hellstrom WJG. Stimulation of collagen production in an vitro model for Peyronie's disease. *Int J Impot Res* 1999; 11: 207-212
2. Andresen R, Wegner HEH, Miller K, Banzer D. Imaging modalities in Peyronie's disease. *Eur Urol* 1998; 34: 128-135
3. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Impaired Smad7-Smurf-mediated negative regulation of TGF-beta signaling in scleroderma fibroblasts. *J Clin Invest* 2004; 113: 253-264
4. Balconi G, Angeli E, Nessi R, de Flaviis L. Ultrasonographic evaluation of Peyronie's disease. *Urol Radiol* 1988; 10: 85-88
5. Billig R, Baker R, Immergut M, Maxted W. Peyronie's disease. *Urology* 1975; 6: 409-418
6. Braun M, Wassmer G, Klotz T, Reifenrath B, Mathers M, Engelmann U. Epidemiology of erectile dysfunction: results of the "Cologne Male Survey". *Int J Impot Res* 2000; 12: 305
7. Briganti Alberto, Salonia Andrea, Deho Federico, Zanni Giuseppe, Rokkas Konstantinos, Rigatti Patrizio, Montorsi Francesco. Peyronie's disease: a review. *Curr Opin Urol* 2003; 13: 417-422
8. Brock G, Hsu GL, Nunes L, von Heyden B, Lue TF. The anatomy of the tunica albuginea in the normal penis and Peyronie's disease. *J Urol* 1997; 157: 276-281
9. Byström J, Rubio C. Induratio penis plastica. Peyronie's disease. Clinical features and etiology. *Scand J Urol* 1975; 10: 12-20
10. Carson CC, Chun JL. Peyronie's disease: surgical management: autologous materials. *Int J Impot Res* 2002; 14: 329-335
11. Castro RMP, Vallejo MEL, Lopez JCR, Kindelan JA, Tapia MJR. Combined treatment with Vitamin E and cochinine in the early stages of Peyronie's disease. *BJU Int* 2003; 91: 522-524
12. Chang JA, Gholami SS, Lue TF. Surgical management: saphenous vein grafts. *Int J Impot Res* 2002; 14: 375-378
13. Cormio L, Zizzi V, Bettocchi C, Berardi B, Sblendorio D, Traficante A, Selvaggi FP. Tunica albuginea application for the correction of penile curvature. *Scand J Urol* 2002; 36: 307-310

## 8. Literaturverzeichnis

14. Davis CJ Jr. The microscopic pathology of Peyronie's disease. J Urol 1997; 157: 282-284
15. De la Peyronie F. Sur quelques obstacles qui s'opposent à l'éjaculation naturelle de la semence. Mem Acad Roy Chir 1743; 1: 425-439. Neuausgabe 1819: 318-333
16. Derynck R. Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. Nature 2003; 425: 577-584
17. Devine CJ Jr, Horton CE. Surgical treatment of Peyronie's disease with a dermal graft. J Urol 1974; 111: 44-49
18. Devine CJ Jr, Somers KD, Jordan GH, Schlossberg SM. Proposal: Trauma as the cause of the Peyronie's lesion. J Urol 1997; 157: 285-290
19. Devine CJ Jr. International conference on Peyronie's disease. Advances in basic and clinical research. Introduction. J Urol 1997; 157: 272-275
20. Di Stasi SM, Giannantoni A, Capelli G, Jannini EA, Virgilli G, Storti L, Vespasiani G. Transdermal electromotive administration of verapamil and dexamethasone for Peyronie's disease. BJU Int 2003; 91: 825-829
21. Di Stasi Sm, Giannantoni A, Stephen RL, Capelli G, Giurioli A, Jannini EA, Vespasiani G. A prospective, randomized study using transdermal electromotive administration of Verapamil and Dexamethasone for Peyronie's disease. J Urol 2004; 171: 1605-1608
22. Duncan MR, Berman B, Nseyo UO. Regulation of the proliferation and biosynthetic activities of cultured human Peyronie's disease fibroblasts by interferons-alpha, -beta and -gamma. Scand J Urol Nephrol 1991; 141: 89-94
23. Eickelberg O, Pansky A, Koehler E, Bihl M, Tamm M, Hildebrand P, Perruchoud AP, Kashgarian M, Roth M. Molecular mechanisms of TGF-beta antagonism by interferon-gamma and cyclosporine A in lung fibroblasts. FASEB 2001; 15: 797-806
24. Eickelberg O. Endless Healing: TGF-beta, SMADs and fibrosis. FEBS Letters 2001; 506: 11-14
25. Eickelberg O, Yeager ME, Grimminger F. The tantalizing triplet of pulmonary hypertension-BMP receptors, serotonin receptors, and angiopoietins. Cardiovasc Res 2003; 60: 465-467

## 8. Literaturverzeichnis

26. Eickelberg O, Hecker M. TGF-beta Signaling: The Known and the Unknown. *Zellbiologie aktuell* 2004; 2: 20-23
27. El-Sakka AI, Hassoba HW, Pillarisetty RJ, Dahiva R, Lue TF. Peyronie's disease is associated with an increase in transforming growth factor-beta protein expression. *J Urol* 1997; 158: 1391-1394
28. El-Sakka AI, Hassoba HM, Chui RM, Bhatnagar RS, Dahiya R, Lue TF. An animal model of Peyronie's like condition associated with an increase of transforming growth factor beta mRNA and protein expression. *J Urol* 1997; 158: 2284-2290
29. El-Sakka AI, Lue TF. Peyronie's disease. *Curr Opin Urol* 1998; 8: 203-209
30. Epstein FH, Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1350-1358
31. Feil G, Bichler KH, Lahme S, Götz T. Cytokinuntersuchungen im Serum von Patienten mit Induratio penis plastica. *Aktuelle Urol* 2001; 32 (suppl 1): 33-36
32. Furlow WL, Swanson HE Jr, Lee RE. Peyronie's disease: a study of its natural history and treatment with orthovoltage radiotherapy. *J Urol* 1975; 114: 69-71
33. Gefen A, Elad D, Chen J. Biomechanical aspects of Peyronie's disease in development stages and following reconstructive surgery. *Int J Impot Res* 2002; 14: 389-396
34. Gelbard MK, Dorey F, James K. The natural history of Peyronie's disease. *J Urol* 1990; 144: 1376-1379
35. Gholami SS, Lue TF. Peyronie's disease. *Urol Clin North Am* 2001; 28: 377-390
36. Gholami SS, Gonzalez-Cadavid NF, Lin CS, Rajfer J, Lue TF. Peyronie's disease: a review. *J Urol* 2003; 169: 1234-1241
37. Gurunadha HS, Tunuguntla R. Management of Peyronie's disease - a review. *World J Urol* 2001; 19: 244-250
38. Hakim LS. Peyronie's disease: an update. The role of diagnostics. *Int J Impot Res* 2002; 14: 321-323
39. Hauck EW, Heitz M, Schreiter F, Weidner W. Induratio penis plastica. *Aktuelle Urol* 1999; 30: 386-404

## 8. Literaturverzeichnis

40. Hauck EW, Weidner W. François de la Peyronie and the disease named after him. *Lancet* 2001; 357: 2049-2051
41. Hauck EW, Schroeder-Printzen I, Weidner W. Konservative Therapie der Induratio penis plastica. *Aktuelle Urol* 2001; 32 (suppl 1): 44-47
42. Hauck EW, Bschleipfer T, Diemer T, Manning M, Schroeder-Printzen I, Weidner W. Long-term results of plaque thinning with carbide burs, small incisions and venous grafting for correcting complex penile curvature in Peyronie's disease: poor results of an "ideal" approach. *J Urol* 2002; 167: 2070-2073
43. Hauck EW, Hackstein N, Vosschenrich R, Diemer T, Schmelz HU, Bschleipfer T, Schroeder-Printzen I, Weidner W. Diagnostic value of magnetic resonance imaging in Peyronie's disease - a comparison both with palpation and ultrasound in the evaluation of plaque formation. *Eur Urol* 2003; 43: 293-300
44. Hauck E, Hauptmann A, Weidner W, Bein G, Hackstein H. Non-association of Peyronie's disease with the antigens of the human leukocyte antigen (HLA)-system. *Eur Urol Supplements* 2003; 2 (suppl 1): 123 abstract 484
45. Hauck EW, Hauptmann A, Haag SM, Weidner W. Neue Aspekte zur Ätiopathogenese der Induratio penis plastica. *Aktuelle Urol* 2003; 34: 387-391
46. Hauck EW, Schmelz HU, Diemer T, Fenchel K, Weidner W, Knoblauch B. Case report. Epitheloid sarcoma of the penis- a rare differential diagnosis of Peyronie's disease. *Int J of Impot Res* 2003; 15: 378-382
47. Hauck EW, Domann E, Hauptmann A, Weidner W, Chakraborty T, Hossain HM. Prospective Analysis of 16S<sub>R</sub>DNA as a highly sensitive Marker for bacterial Presence in Peyronie's disease Plaques. *J Urol* 2003; 170: 2053-2056
48. Hauck EW, Hauptmann A, Bschleipfer T, Schmelz HU, Altinkilic BM, Weidner W. Questionable Efficacy of Extracorporeal shock wave therapy for Peyronie's disease: Results of a prospective approach. *J Urol* 2004; 171: 296-299
49. Hauck EW, Müller UO, Bschleipfer T, Schmelz HU, Diemer T, Weidner W. Extracorporeal shock-wave Therapy for Peyronie's disease: Exploratory Meta-Analysis of Clinical Trials. *J Urol* 2004; 171: 740-745



## 8. Literaturverzeichnis

50. Hellstrom WJG, Bivalacqua TJ. Peyronie's disease: Etiology, medical, and surgical therapy. *J Androl* 2000; 21: 347-354
51. Holterhus PM, Hiort O, Demeter J, Brown PO, Brooks JD. differential gene-expression patterns in genital fibroblasts of normal males and 46,XY females with androgen insensitivity syndrome: evidence for early programming involving the androgen receptor. *Genome Biology* 2003; 4: R37
52. Horton CE, Sadove RC, Devine CJ Jr. Peyronie's disease. *Ann Plast Surg* 1987; 18: 122-127
53. Iacono F, Barra S, de Rosa G, Boscaino A, Lotti T. Microstructural disorders of tunica albuginea in patients affected by Peyronie's disease with or without erection dysfunction. *J Urol* 1993; 150: 1806-1809
54. Kadioglu A, Tefekli A, Erol B, Oktar T, Tunc M, Tellaloglu S. A retrospective review of 307 men with Peyronie's disease. *J Urol* 2002; 168: 1075-1079
55. Kelâmi A. Autophotography in evaluation of functional penile disorders. *Urology* 1983; 21: 628-629
56. Kelâmi A. AutoPhotographie und die funktionellen Erkrankungen des Penis. *Urologe [B]* 1983; 23: 133-134
57. Kelâmi A, Pryor JP, Hubinont PO. Peyronie's disease. *Operative Andrology* 1. *Progress in Reproductive Biology and Medicine* 1983. Vol. 9: 1-4 Karger
58. Kim BC, Kim HT, Park SH, Cha JS, Yufit T, Kim SJ, Falanga V. Fibroblasts from chronic wounds show altered TGF-beta signaling and decreased TGF-beta Type II Receptor expression. *J Cell Physiol* 2003; 195: 331-336
59. Kotzan S, Hüppe T, Weinknecht S, Bismarck E, Lahme S, Claussen CD. Bildgebende Diagnostik bei Induratio penis plastica. *Aktuelle Urol* 2001; 32 (suppl 1): 10-13
60. Kretschmer A, Moepert K, Dames S, Sternberger M, Kaufmann J, Klippel A. Differential regulation of TGF-beta signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Oncogene* 2003; 22: 6748-6763
61. Kuga H, Morisaki t, Nakamura K, Onishi H, Noshiro H, Uchiyama A, Tanaka M, Katano M. Interferon-gamma suppresses transforming growth factor-beta-induced invasion of gastric carcinoma cells through cross-talk of Smad pathway in a three-dimensional culture model. *Oncogene* 2003; 22: 7838-7847

## 8. Literaturverzeichnis

62. Lacy GL, Adams DM, Hellstrom WJG. Intralesional interferon-alpha-2b for the treatment of Peyronie's disease. *Int J Impot Res* 2002; 14: 336-339
63. Ledda A. Diabetes, hypertension and erectile dysfunction. *Cur Med Res Opin* 2000 (suppl. 1) S17-S20
64. Leffell MS, Devine CJ Jr, Horton CE, Somers KD, Dawson D, Vande Berg JS, Bluemink GG, Wright GL Jr. Non-association of Peyronie's disease with HLA B7 cross-reactive antigens. *J Urol* 1982; 127: 1223-1224
65. Levine LA, Lenting EL. A surgical treatment algorithm for Peyronie's disease. *J Urol* 1996; 155 (suppl): 633A abstract 1288
66. Levine LA, Lenting EL. A surgical algorithm for the treatment of Peyronie's disease. *J Urol* 1997; 158: 2149-2152
67. Levine LA, Estrada CR. Two years experience with pericardial graft repair for Peyronie's disease. *J Urol* 2002; 167 (suppl): 206 abstract 828
68. Levine LA, Estrada C. Intralesional verapamil for the treatment of Peyronie's disease: a review. *Int J Impot Res* 2002; 14: 324-328
69. Lindsay MB, Schain DM, Grambsch P, Benson RC, Beard CM, Kurland LT. The incidence of Peyronie's disease in Rochester, Minnesota, 1950 through 1984. *J Urol* 1991; 146: 1007-1009
70. Lopez JA, Jarow JP. Penile vascular evaluation of men with Peyronie's disease. *J Urol* 1993; 149: 53-55
71. Lue TF. Peyronie's disease: an anatomically-based hypothesis and beyond. *Int J Impot Res* 2002; 14: 411-413
72. Lutz M, Knaus P. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signaling network. *Cell Signal* 2002; 14: 977-988
73. Magee TR, Qian A, Rajfer J, Sander FC, Levine LA, Gonzalez-Cadavid NF. Gene expression profiles in the Peyronie's disease plaque. *Urology* 2002; 59: 451-457
74. Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 169-178
75. Michel MS, Köhrmann KU, Alken P. Therapie der Induratio penis plastica mittels Stoßwelle. Eine kritische Literaturübersicht. *Aktuell Urol* 2001; 32 (suppl 1): 65-67
76. Montorsi F, Guazzoni G, Bocciardi A, Barbieri L, Campo B, Rigatti P. Transdermal electro motive multi-drug administration for Peyronie's disease:

## 8. Literaturverzeichnis

- A randomized, double-blind, placebo-controlled, partial crossover study. J Urol 1995; 153 (suppl): 472A abstract 973
77. Mulcahy JJ, Wilson SK. Management of Peyronie's disease with penile prosthesis. Int J Impot Res 2002; 14: 384-388
  78. Mulhall JP, Thom J, Lubrano T, Shankey TV. Basic fibroblast growth factor expression in Peyronie's disease. J Urol 2001; 165: 419-423
  79. Mulhall JP, Branch J, Lubrano T, Shankey TV. Radiation increases fibrogenic cytokine expression in Peyronie's disease fibroblasts. J Urol 2001; 165 (suppl): 200 abstract 830
  80. Mulhall JP, Anderson MS, Lubrano T, Shankey TV. Peyronie's disease cell culture models: phenotypic, genotypic and functional analyses. Int J Impot Res 2002; 14: 397-405
  81. Mynderse LA, Monga M. Oral therapy for Peyronie's disease. Int J Impot Res 2002; 14: 340-344
  82. Nöske HD, Hauck EW. Morbus Lapeyronie aus historischer Sicht. Aktuell Urol 2001; 32 (suppl 1): 2-6
  83. Oeynhausien D, Oelbracht K, Zumbé J. Ergebnisse der Extrakorporalen Stoßwellentherapie (ESWT) bei der Induratio penis plastica. Aktuelle Urol 2001; 32 (suppl 1): 58-60
  84. Perimenis P, Athanasopoulos A, Gyftopoulos K, Katsenis G, Barbalias G. Peyronie's disease: Epidemiology and clinical presentation in 134 cases. Int Urol Nephrol 2001; 32: 691-694
  85. Pryor JP, Farell CR. Controlled clinical trial of vitamin E in Peyronie's disease. Prog Reprod Biol Med 1983; 9: 41-45
  86. Pryor JP, Ralph DJ. Clinical presentations of Peyronie's disease. Int J Impot Res 2002; 14: 414-417
  87. Purohit SK, Bivalacqua TJ, Minor LC, Rajasikaram M, Abdel-Mageed AB, Sikka SC, Hellstrom WJG. Increased collagen type I and III fibers in the Peyronie's disease rat model. J Urol 1999, 161 (Suppl): A838 abstract 219
  88. Reporters and Participants of the 1<sup>st</sup> Latin American Erectile Dysfunction Consensus Meeting. Peyronie's disease. Chapter 10. Int J Impot Res 2003; 15, 36-40

## 8. Literaturverzeichnis

89. Ralph DJ, Schwartz G, Moore W, Pryor JP, Erbringer A, Bottazzo GF. The genetic and bacteriological aspects of Peyronie's disease. J Urol 1997; 157: 291-294
90. Ralph DJ, Minhas S. The management of Peyronie's disease. BJU Int 2004; 93: 208-215
91. Ralph DJ, Minhas S. The management of Peyronie's disease. BJU Int 2004; 93: 208-215
92. Riedl CR, Plas E, Engelhardt P, Pflüger H. Iontophoresis for the treatment of Peyronie's disease. J Urol 1998; 159 (suppl 5): 117 abstract 451
93. Rompel R, Weidner W. Induratio penis plastica - Eine Übersicht. Fertilität 1991; 7: 90-97
94. Rompel R, Weidner W, Mueller-Eckhardt G. HLA association of idiopathic Peyronie's disease: an indication of autoimmune phenomena in etiopathogenesis? Tissue Antigens 1991; 38: 104-106
95. Rompel R, Mueller-Eckhardt G, Schroeder-Printzen I, Weidner W. HLA antigens in Peyronie's disease. Urol Int 1994; 52: 34-37
96. Schneider T, Sperling H, Schenck M, Schneider U, Rübben H. Treatment of penile curvature-how to combine the advantages of simple plication and the Nesbit-procedure by superficial excision of the tunica albuginea. World J Urol 2003; 20: 350-355
97. Schouman-Claeys E. Valeur et place de l'imagerie de la maladie de La Peyronie. Andrologie 1998; 8: 148-156
98. Schroeder-Printzen I, Hauck EW, Weidner W. New aspects in Peyronie's disease- a mini review. Andrologia 1999; 31 (suppl 1): 31-35
99. Schubert GE. Induratio penis plastica (IPP) - Pathomorphologische Gesichtspunkte. In: Weisbach L, Boedefeld EA, Widmann T, Herausgeber. IPP Symposium. Aachen: Brimberg; 1985. 23-37
100. Schwarzer U, Sommer F, Klotz T, Braun M, Reifenrath B, Engelmann U. The prevalence of Peyronie's disease: results of a large survey. BJU Int 2001; 88: 722-730
101. Shah PJR, Green NA, Adib RS, et al. A multicentre double-blind controlled clinical trial of potassium paraaminobenzoate (Potaba) in Peyronie's disease. Prog Reprod Biol 1983; 9: 47-60

## 8. Literaturverzeichnis

102. Shi Y, Massagué. Mechanisms of TGF-beta Signaling from cell Membrane to the Nucleus. *Cell* 2003; 113: 85-700
103. Smith BH. Peyronie's disease. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: 670-678
104. Smith BH. Subclinical Peyronie's disease. *Am J Clin Pathol* 1969; 52: 385-390
105. Somers KD, Dawson DM, Wright GL Jr, Leffell MS, Rowe MJ, Bluemink GG, Vande Berg JS, Gleischman SH, Devine CJ Jr, Horton CE. Cell culture of Peyronie's disease plaque and normal penile tissue. *J Urol* 1982; 127: 585-588
106. Somers KD, Winters BA, Dawson DM, Leffell MS, Wright GL Jr, Devine CJ Jr, Gilbert DA, Horton CE. Chromosome abnormalities in Peyronie's disease. *J Urol* 1987; 137: 672-675
107. Somers KD, Dawson DM. Fibrin deposition in Peyronie's disease plaque. *J Urol* 1997; 157: 311-315
108. Somers KD, Sismour EN, Wright GL Jr, Devine CJ Jr, Gilbert DA, Horton CE. Isolation and characterization of collagen in Peyronie's disease. *J Urol* 1989; 141: 629-631
109. Sommer F, Schwarzer U, Wassmer G, Bloch W, Braun M, Klotz T, Engelmann U. Epidemiology of Peyronie's disease. *Int J Impot Res* 2002; 14: 379-383
110. Strohmaier WL. Operative Therapie der Induratio penis plastica. *Aktuelle Urol* 2001; 32 (suppl 1): 72-76
111. Ulloa I, Doody J, Massagué J. Inhibition of transforming growth-factor-beta/ SMAD signaling by the Interferon-gamma/ STAT pathway. *Nature* 1999; 397: 710-713
112. Usta MF, Adams DM, Zhang JW, Hellstrom WJG. Penile epithelioid sarcoma and the case for a histopathological diagnosis i Peyronie's disease. *BJU Int* 2003; 91: 519-521
113. Usta MF, Hellstrom W, Jabren GW, Myers L, Garcia M, Bivalacqua TJ. Is there a relationship between the severity of penile curvature and risk factors in patients with Peyronie's disease? *J Urol* 2003; 169 (suppl): 273 abstract 1062
114. Usta MF, Bivalacqua TJ, Jabren GW, Myfers L, Sanabria J, Sikka SC, Hellstrom WJG. Relationship between the severity of penile curvature and

## 8. Literaturverzeichnis

- the presence of comorbidities in men with Peyronies's disease. J Urol 2004; 171: 775-779
115. Van der Drift DGF, Vroege JA, Groenendijk PM, Slob AK, Schröder FH, Mikisch GHJ. The plication procedure for penile curvature: surgical outcome and postoperative sexual functioning. Urol Int 2002; 69: 120-124
116. Van der Water L. Mechanisms by which fibrin and fibronectin appear in healing wounds: implications for Peyronie's disease. J Urol 1997; 157: 306-310
117. Vande Berg JS, Devine CJ, Horton CE, Somers KD, Wright GL Jr, Leffell MS, Dawson DM, Gleischman SH, Rowe MJ. Peyronie's disease: an electron microscopic study. J Urol 1981; 126: 333-336
118. Vande Berg JS, Devine CJ Jr, Horton CE, Somers KD, Wright GL Jr, Leffell MS, Dawson DM, Gleischman SH, Rowe MJ. Mechanisms of calcification in Peyronie's Disease. J Urol 1982; 127: 52-54
119. Vosschenrich R, Schroeder-Printzen I, Weidner W, Fischer U, Funke M, Ringert RH. Value of magnetic resonance imaging in patients with penile induration (Peyronie's disease). J Urol 1995; 153: 1122-1125
120. Weidner W, Schroeder-Printzen I, Rudnick J, Weiske WH, Krause W, Aulitzky W, Drawz B, Rebmann U, Pastarmadjeff L, Kallerhoff M, Lenk S, Schnitker J. Randomized prospective placebo-controlled therapy of Peyronie's disease (IPP) with Potaba® (Aminobenzoate Potassium). Eur Urol 1996; 30 (suppl 2): 228 abstract 847
121. Weidner W, Schroeder-Printzen I, Rudnick J, Krause W, Weiske WH, Drawz B, Rebmann U, Pastarmadjeff L, Kallerhoff M, Lenk S, Sperling H, Kliesch S, Schnitker J, Aulitzky W. Randomized prospective placebo-controlled therapy of Peyronie's disease (IPP) with Potaba® (Aminobenzoate potassium). J Urol 1999; 161 (suppl): 205 abstract 785
122. Weidner W, Schroeder-Printzen I, Weiske WH, Vosschenrich R. Sexual dysfunction in Peyronie's disease: an analysis of 222 patients without previous local plaque therapy. J Urol 1997; 157: 325-328
123. Weidner W. Internationale Konferenz über Induratio penis plastica (IPP) 17.-19. März 1993, Washington Bethesda. Aktuelle Urol 1993; 24: 372-374
124. Wilbert D. Induratio penis plastica - eine Übersicht. Aktuelle Urol 2001; 32 (suppl 1): 7-9

## 8. Literaturverzeichnis

125. Willscher MK, Cwazka WF, Novicki DE. The association of histocompatibility antigens of the B7 cross-reacting group with Peyronie's disease. J Urol 1979; 122: 34-35
126. Xu L, Massagué. Nucleocytoplasmic Shuttling of Signal Transducers. Nature reviews. Molecular Cell Biology 2004; 5: 1-10
127. Zimmermann R, Lahme S, Kuczyk M, Stenzl A, Feil G. Die Bedeutung von transforming growth factor-b (TGF-beta-1-b) und Interferon-g (IFN-g) in der Pathophysiologie der Induratio penis plastica (IPP). Urologe [A]; 2004 (Suppl 1); S39: Pexp 6.16

### 9. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
alpha-SMA	alpha-Smooth-Muscle-Actin
BMP	Bone morphogenetic proteins
bp	base pairs
BSA	bovine serum albumin
cDNA	copy DNA (Desoxyribonukleinsäure)
CRP	C-reaktives Protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
DICC	dynamische Infusionspharmakokavernosographie und- kavernosometrie
DNA	Desoxyribonucleine acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EGF	Epidermal Growth Factor
ESWT	Extrakorporale Stoßwellen Therapie
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FGF-b	Fibroblast Growth Factor basis
HLA	Humanes Lymphozyten Antigen
IFN-gamma	Interferon-gamma
IgM	Immunglobulin M
IPP	Induratio penis plastica
JAK	janus kinase
MAD	Mothers against Decapentaplegic
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
OP	Operation
PBS	phosphated buffered saline
PD	Peyronie's disease
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase chain reaction
SARA	SMAD anchor for receptor activation
SKAT	Schwellkörperautoinjektionstest



## 9. Abkürzungsverzeichnis

SMA	Small body size
Smad	Transkriptionsfaktor, Name zusammengesetzt aus SMA und MAD
STAT	signal transducer and activator of transcription
TGF-beta	tumor growth factor beta
TNF-alpha	tumor necrosis factor-alpha

## 10. Publikationen

### 10.1 Originalarbeiten:

- Haag SM, Hauck EW, Szardening-Kirchner C, Cha ES, Eickelberg O, Weidner W. Alterations of the Transforming-Growth-Factor-beta Pathway as a Potential Factor in the Pathogenesis of Peyronie's disease. J Urol 2005 (under submission)
- Hauck EW, Bschleipfer T, Haag SM, Rohde V, Weidner W. Ergebnisse einer Umfrage zur Einschätzung der verschiedenen konservativen Therapieverfahren der Induratio penis plastica unter deutschen Urologen. Urologe, Urologe A 2005 (in press)
- Hauck EW, Hauptmann A, Haag SM, Bohnert A, Weidner W, Bein G, Hackstein H: Alpha-1-Antitrypsin Levels and Genetic Variation of the Alpha-1-Antitrypsin Gene in Peyronie's disease. Eur Urol 2004;46: 623-628

### 10.2 Übersichtsarbeiten:

- Hauck EW, Hauptmann A, Haag SM, Weidner W: Neue Aspekte zur Ätiopathogenese der Induratio penis plastica. Aktuel Urol 2003; 34:387-391

### 10.3 Abstracts:

- Haag SM, Hauck EW, Altinkilic B, Eickelberg O, Weidner W. Alterations in the Transforming-Growth-Factor-beta Pathway as a Possible Risk Factor in the Pathogenesis of Peyronie's disease. (wird als Poster auf der DGU 2005 in Düsseldorf präsentiert) Veröffentlichung im Sonderheft der DGU im Herbst 2005; Urologe 2005; abstract P exp A-002-0901-00113
- Haag SM, Hauck EW, Altinkilic B, Eickelberg O, Weidner W. Alterations in the Transforming-Growth-Factor-beta Pathway as a Possible Risk Factor in the Pathogenesis of Peyronie's disease. (als Vortrag präsentiert auf dem Kongreß der „American Urological Association“ 2005 in San Antonio) J Urol 2005; 173 (suppl 4): 254; abstract 939

## 10. Publikationen

- Hauck E, Haag S, Eickelberg O, Atinkilic B, Weidner W. Alterations in the Transforming-Growth-Factor-beta Signal Transduction Pathway in Peyronie's disease. Eur Urol 2004 (suppl 4): 3 abstract 853
- Hauck E, Haag S, Eickelberg O, Atinkilic B, Weidner W. Human Dermal Fibroblasts: Are they a Model for Peyronie's disease? Eur Urol 2004 (suppl 4): 3 abstract 861
- Hauck E, Hauptmann A, Haag SM, Bohnert A, Weidner W, Bein G, Hackstein H. Prospective analysis of alpha-1-antitrypsin levels and of genetic variation of the alpha-1-antitrypsin gene in patients with Peyronie's disease. J Sex Med 2004; 1 (suppl 1): 49 abstract O66
- Hauck E, Hauptmann A, Haag SM, Bohnert A, Weidner W, Bein G, Hackstein H: Prospective analysis of alpha-1-antitrypsin levels and investigation of genetic variation of the alpha-1-antitrypsin gene in patients with Peyronie's disease. Urologe A 2004; 43 (suppl 1): S39 abstract P exp 6.15
- Hauptmann A, Hauck E, Bohnert A, Haag S, Weidner W, Bein G, Hackstein H. Alpha-1-antitrypsin levels and genetic variation of the alpha-1-antitrypsin gene in Peyronie's disease. Eur Urol Supplements 2004; 3: 186 abstract 732

### 11. Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

### 12. Danksagung

Mein herzlichen Dank gebührt Herrn Prof. Dr. W. Weidner, Direktor der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, für sein stetes Interesse und seinen Beistand bei der Realisierung der Arbeit, insbesondere für die Ermöglichung zur Freistellung aus dem Klinikalltag zur Fertigstellung der Arbeit.

Ganz besonders danke ich meinem Betreuer Herrn PD Dr. E. W. Hauck für die Überlassung des Themas, die freundschaftliche und hervorragende Zusammenarbeit, seinen persönlichen Einsatz und Engagement. Ich danke für die vielen fachlichen Diskussionen, Anregungen und aufmunternde Worte.

Einen besonderen Dank gebührt Herrn Schadrack von der Firma Glenwood zur Initiierung einer Stiftung zur Förderung der Grundlagenforschung bei IPP. Ohne das Stipendium der Firma Glenwood wäre mir die Laborarbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. O. Eickelberg, Programmdirektor des internationalen Graduierten Programms „Molecular Biology and Medicine of the lung“ und Laborleiter danke ich besonders für die Unterstützung, seine Anregungen und der Verfügungstellung von Labor und Labormaterialien. Dem Team des Labors danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung. Besonders möchte ich Eun-Sook Cha für ihre Freundschaft und Beratung bei den Experimenten danken. Lokesh V. Battula und Ali Önder Yildirim danke ich für die Zurverfügungstellung der Primer und für die wissenschaftlichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. G. Bein möchte ich danken, da er meine erste Kontaktperson auf der Suche nach einem Promotionsthema war und den Kontakt zu Herrn PD Dr. E. W. Hauck, beziehungsweise später zu Herrn Dr. O. Eickelberg herstellte.

Für die Freundschaft, Geduld, Beratung, die zahlreichen beflügelnden Ideen und ihre Unterstützung danke ich Carolin Szardening-Kirchner. Vielen Dank an Anette Hanschke, Kerstin Wilhelm und Tanja Bloch für die gute Atmosphäre im urologischen Labor und ihre Unterstützung vor allem in der Anfangsphase.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für ihre persönliche und finanzielle Unterstützung. Besonders danke ich Volkert für die aufbauenden und beruhigenden Worte und das große Verständnis.

## 12. Danksagung

Allen nicht aufgeführten Personen, die auf ihre eigene Art und Weise, sei es durch Anregungen oder aufmunternde Worte, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei herzlich gedankt.

**13. Lebenslauf**

Simone Mathilde Haag

geboren am 24. Juli 1972 in Kaiserslautern

August 1979 – Juli 1983

Grundschule Hochspeyer

August 1983 – Juni 1992  
1992

St. Franziskus- Gymnasium Kaiserslautern  
Abitur

Oktober 1992 – Juni 1999

Studium der Humanmedizin an der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

15. April 1999

Hochschulabschluß

Mai - Dezember 1999

Promotionssemester

Januar – Dezember 2000

Ärztin im Praktikum in der Chirurgie  
des Klinikums Bamberg

Januar – Juni 2001

Ärztin im Praktikum in der Urologie  
des Klinikums Wetzlar

01. Juli 2001

Approbation

Juli 2001 – Juni 2002

Assistenzärztin in der Urologie des Klinikums  
Wetzlar

Juli 2002 – Juni 2003

Stipendiatin des Glenwood-Stipendiums zur  
Förderung der Grundlagenforschung bei IPP an  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Juli 2003 – Mai 2004

Assistenzärztin in der Urologie des  
Universitätsklinikums Gießen

Juni – September 2004

Stipendiatin des Glenwood-Stipendiums zur  
Förderung der Grundlagenforschung bei IPP an  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

ab Oktober 2004

Assistenzärztin in der Urologie des  
Universitätsklinikums Gießen

Gießen, 21. August 2005

Simone Haag